

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 11 月 11 日 (11.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/097019 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12P 21/08, C12Q 1/68, A61K 39/395, 48/00, A61P 43/00, 37/02, G01N 33/53

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所, Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006403

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 30 日 (30.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-125948 2003 年 4 月 30 日 (30.04.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 杉村 和久 (SUGIMURA, Kazuhisa). 中西 憲司 (NAKANISHI, Kenji).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 敏博 (NAKASHIMA, Toshihiro).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN ANTIHUMAN INTERLEUKIN-18 ANTIBODY, FRAGMENT THEREOF AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: ヒト抗ヒトインターロイキン-18 抗体およびその断片、並びにそれらの利用方法

(57) Abstract: A human antihuman IL-18 antibody originating in humans, which is an antibody against human IL-18, containing an H chain complementarity determining region comprising the following polypeptide (a) or (b) and an L chain complementarity determining region to human interleukin-18 comprising the following polypeptide (c) or (d). (a) A polypeptide consisting of an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:4 to 6. (b) A polypeptide which is a modification of the polypeptide (a) and serves as an H chain complementarity determining region. (c) A polypeptide consisting of an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:10 to 12. (d) A polypeptide which is a modification of the polypeptide (c) and serves as an L chain complementarity determining region. Thus, it becomes possible to provide a human antihuman IL-18 antibody and a method of using the same.

(57) 要約: 本発明のヒト由来のヒト抗ヒト IL-18 抗体は、ヒト IL-18 に対する抗体であり、以下の (a) または (b) のポリペプチドからなる H 鎖の相補性決定領域と、(c) または (d) のポリペプチドとからなる、ヒトインターロイキン-18 に対する L 鎖の相補性決定領域とを含むものである。(a) 配列番号 4~6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。(b) (a) に記載のポリペプチドの改変体であって、H 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。(c) 配列番号 10~12 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。(d) (c) に記載のポリペプチドの改変体であって、L 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。これにより、ヒト抗ヒト IL-18 抗体およびその利用方法を提供することが可能となる。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/097019 A1

This Page Blank (uspto)

明 細 書

ヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体およびその断片、並びにそれらの利用方法

技術分野

5 本発明は、ヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体およびその断片、並びにそれらの利用方法に関し、より詳細には、ヒトインターロイキン-18（以下、ヒト IL-18 とする）に結合し、その生理活性を阻害するヒト抗ヒト IL-18 抗体およびその抗体フラグメント、並びにそれらの利用方法に関するものである。この抗体及び抗体フラグメントは、IL-18 が原因となって惹起される炎症、免疫異常
10 性疾患の治療薬として期待される。

背景技術

 アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis (AD)）は、主に外的刺激に対する炎症性皮膚病変で、慢性反復性の強い掻痒を伴う疾患である。AD発症のメカニズム
15 は不明な点が多いが、AD発症には遺伝的背景があり、AD患者の血清中には高いレベルの IgE が存在する。また、AD 発症のメカニズムには、活性化 T 細胞、好塩基球、肥満細胞が深く関与する。特に、アレルゲンによる肥満細胞あるいは好塩基球上の Fcε 受容体 (FcεR) に結合した IgE 分子の架橋によって、これらの細胞が活性化される。その結果、2型ヘルパーT (Th2) 細胞由来のサイトカインとケミカルメディエーターとの産生が起こり、AD が発症すると考えられている。Th2 サイトカインとして重要なのは、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 等であり、ケミカルメディエーターとして重要なのは、ヒスタミン、セロトニン、ロイコトリエン等である。
20

 ヘルパーT 細胞 (Th) は、抗原刺激を受けるとサイトカインを産生するが、その産生パターンから2つの亜集団 (Th1 と Th2 細胞) に分類される。1型ヘルパーT (Th1) 細胞が刺激を受けると IFN-γ、IL-2、TNF-β などの Th 1 サイトカインを産生し、2型ヘルパーT (Th2) 細胞が刺激を受けると IL-4、IL-5、IL-
25

10、IL-13 などの Th 2 サイトカインを産生する。前者 (Th1 細胞) はおもに細胞性免疫を誘導し、後者 (Th2 細胞) は液性免疫を誘導し、ときにはアレルギー応答を誘導する。ナイーブ T 細胞は、IL-12 の存在下で抗原刺激を受けると Th1 細胞に、また IL-4 の存在下で抗原刺激を受けると Th2 細胞に分化する。

- 5 IL-18 は、発見当初、T 細胞や NK (ナチュラルキラー) 細胞から IFN- γ の産生を誘導する因子として注目されていた (Okamura, H. et al. Nature 378, 88(1995).)。しかし、IL-18 がこのような機能を発揮するのは IL-12 が共存した場合である (Nakanishi, K. et al., Annu. Rev. Immunol., 19, 423 (2001))。また、Th 1 サイトカインである IFN- γ は、Th 2 サイトカインである IL-4
10 の作用を阻止するので、IFN- γ を誘導する IL-18 は、Th 2 細胞による免疫反応を抑制し、抗アレルギー作用を示すと考えられた。

- 寄生虫をマウスに感染させると、Th2 細胞が誘導され IgE 産生がおこる。発明者は、感染直後から IL-12 と IL-18 とを投与すると、T 細胞、NK 細胞、B 細胞などから、IFN- γ の産生が誘導され IgE 産生が抑制されることを明らかにした (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 3948(1997))。
15

- さらに、IL-18 だけを投与すると IgE 産生が増強されることも明らかにした (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 13962(1999))。また、その後の解析から、IL-18 を正常なマウスに投与すると IgE 産生が誘導されることも明らかとなった (Yoshimoto, T. et al., Nat. Immunol., 1, 132(2000))。
20

- 生体内に投与された IL-18 は、CD4 陽性 T 細胞 (CD4⁺T 細胞) に作用して CD40 リガンド (CD40L) の発現と、IL-4、IL-5、IL-13 等の産生とを誘導する (Yoshimoto, T. et al., J. Exp. Med., 197, 997(2003))。また、生体内で B 細胞は、IL-18 の刺激を受けた CD4 陽性 T 細胞が発現する CD40L と、IL-4 との刺激を受けて IgE を産生する。
25

IL-18 は、in vitro で、IL-3 によって誘導された好塩基球と肥満細胞とに作用して、IL-4、IL-13、ヒスタミン等の産生を誘導する (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

従来の定説では、初めに述べた様に、肥満細胞上の Fc ϵ R に Fc 部位を介して

結合する複数の IgE 分子に、アレルゲンが結合して、これらの IgE 分子を架橋することによって、肥満細胞が活性化されると考えられていた。今もこの定説は正しいが、発明者らは IL-18 が、アレルゲンおよび IgE の介在無しに、直接的に肥満細胞や好塩基球を活性化して IL-4、IL-13、ヒスタミン等の産生を誘導することを明らかにした (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 13962(1999))。この様な場合もアレルギー性炎症がおこる。

IL-18 は、生物学的に不活性な前駆体 (IL-18 前駆体) として産生され、カスパーゼ 1 の作用で開裂されて活性型となり、細胞外に分泌される (Gu, Y. et al., Science, 275, 206(1997))。発明者は、皮膚のケラチノサイトで、IL-18 前駆体が産生されて蓄積されていることから、皮膚のケラチノサイト特異的にカスパーゼ 1 を過剰発現させたマウス (カスパーゼ 1 トランスジェニックマウス) を作製した (Yamanaka, K. et al., J. Immunol., 165, 997(2000))。その結果、このマウスは、生物学的に活性のある IL-18 を大量に産生した。また、このマウスは、血中に大量の IgE を産生していた (Yoshimoto, T. et al., Nat. Immunol., 1, 132(2000), Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。さらに、このマウスは、アレルゲンのない環境で飼育されているにも関わらず、強いアトピー性皮膚炎を発症した (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

ところで、IL-4 と IL-13 のシグナルは、Stat 6 を介して標的細胞の核内に伝達されることで、これらのサイトカインの作用を発揮することが明らかにされている。発明者らは、stat6 を欠損させたマウスが、IgE を産生しないことを明らかにした (Takeda, K. et al., Nature, 380, 627(1996))。そして、この様な Stat 6 遺伝子を欠損させたマウスと、皮膚のケラチノサイト特異的にカスパーゼ 1 を過剰発現させたマウス (カスパーゼ 1 トランスジェニックマウス) とを交配して、stat6 遺伝子欠損カスパーゼ 1 トランスジェニックマウスを作製した。その結果、このマウスは、全く IgE を作らなかったが、強いアトピー性皮膚炎を発症することが明らかとなった (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

一方、発明者は、IL-18 遺伝子を欠損したマウスとカスパーゼ 1 トランスジェ

ニックマウスとを交配することにより、IL-18 欠損カスパーゼ 1 トランスジェニックマウスも作製した。その結果、このマウスは、IgE 産生を抑制されてはいたが、なおも大量の IgE を血中に認めた。ところが、このマウスは、IgE を産生しているにもかかわらず、アトピー性皮膚炎の発症が完全に抑制されていた（
5 Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

これらの結果から、IgE の産生を抑制することよりも、IL-18 の作用を抑制することが、アトピー性皮膚炎の治療に有効と考えられる。

IL-18 は、発見当初 IFN- γ 誘導因子とよばれていたように、IL-12 と相乗的に、Th1 細胞や NK 細胞に作用して IFN- γ の産生を強力に誘導する (Okamura, H.
10 et al. Nature 378, 88(1995)、Nakanishi, K. et al., Annu. Rev. Immunol., 19, 423 (2001))。さらに、IL-18 は、これらの細胞上に Fas リガンド(FasL)の発現を増強する (Tsutsui, H. et al., J. Immunol., 159, 3961(1997))。FasL は、三量体になると、細胞のアポトーシスを誘導する。

発明者は、Propionibacterium acnes を投与したマウスの肝臓に存在する
15 Kupffer 細胞が、Fas を発現しており、FasL の刺激を受けると、活性型の IL-18 を産生することを示した (Tsutsui, H. et al., Immunity, 11, 359(1999))。さらに、IL-18 は、NK 細胞および Th1 細胞に作用して FasL の発現を増強する。このように、IL-18 と FasL との間には、正の相関性 (positive feedback loop) があることも明らかになった (Tsutsui, H. et al., J. Immunol., 159,
20 3961(1997)、Tsutsui, H. et al., Immunity, 11, 359(1999)、Tsutsui, H. et al., Immunol. Rev., 174, 192(2000))。そのため、生体内で IL-18 が過剰に産生されると、肝臓や腸管で重篤な臓器障害が起こることが明らかとなった。このように、IL-18 は、いわゆる Th1 病の原因にもなる。

このような疾患以外にも、Th1 細胞に誘導される気管支喘息、その他の様々
25 な疾患において、IL-18 の病態への関与が指摘されている。

以上のように、IL-18 の産生あるいは活性の制御は、このような IL-18 依存性のアトピー性皮膚炎をはじめとする、IL-18 依存性疾患の治療法として、あるいは IL-18 の過剰産生が原因となり疾患の発症を誘導あるいは増悪する Th1 病の治療法として、極めて重要である。

それゆえ、IL-18 の生理活性を中和する特異的なモノクローナル抗体を開発することができれば、IL-18 の関与する多くの疾患の有効な治療手段になることが期待される。

ところが、ヒト IL-18 に対する抗体（抗ヒト IL-18 抗体）としては、
5 マウスやラット由来のモノクローナル抗体がいくつか取得されているに過ぎない（例えば、日本国公開特許公報 特開 2000-236884 号（2000 年 9 月 5 日公開）、WO 00/56771 の国際出願（2000 年 9 月 28 日公開））。

しかしながら、従来の抗ヒト IL-18 抗体は、主に、ヒト以外の異種動物由来のモノクローナル抗体であるため、ヒトに対して投与した場合、異物として認識・排除される。したがって、従来の抗ヒト IL-18 抗体を、ヒト IL-18 の関与する疾患の治療薬剤として利用することは困難である。特に、慢性の自己免疫性疾患の治療では、長期間の継続投与が行われるので、投与抗体に対する抗体の出現が問題となる。

15 この問題を解決する方法として、ヒト IL-18 に対するマウスモノクローナル抗体を、遺伝子工学的手法を用いてヒト化することが考えられる。

しかしながら、マウスモノクローナル抗体をヒト化すれば、抗原性は低下するものの、慢性の自己免疫性疾患患者に対する反復投与や長期投与を行った際には、そのヒト化抗 IL-18 抗体の活性を阻害するような抗体（阻止抗体）が作り出される可能性も否定できない。その結果、顕著な治療効果は期待できず、場合によ
20 っては重大な副作用が生じる可能性もあるという問題を有している。

それゆえ、反復投与や長期投与を行った場合でも、安全性の高い抗ヒト IL-18 抗体の開発が強く望まれている。

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、安全性と治療
25 効果を兼ね備えたヒト抗ヒト抗インターロイキン-18 抗体およびその断片を提供するとともに、それらの利用方法を提案することにある。

発明の開示

本発明者は、上記課題に鑑みて鋭意に検討した結果、健常人の末梢血 B リンパ

球より調製した免疫グロブリンH鎖およびL鎖の可変領域 (V_H , V_L) をコードする遺伝子を発現したファージディスプレイライブラリーから、完全ヒト抗ヒトIL-18抗体の1本鎖可変領域 (scFv) 分子 (抗体断片) を取得し、そのアミノ酸配列およびそれをコードするcDNAの塩基配列を明らかにした。さらに、このscFvが、ヒトIL-18の生理活性を阻害することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、医学上または産業上有用な方法・物質として下記A) ~ X) の発明を含むものである。

A) ヒトインターロイキン-18に対する、ヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

B) 以下の (a) または (b) のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域と、(c) または (d) のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域とを含む上記A) に記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

(a) 配列番号4~6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号4~6に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

(c) 配列番号10~12に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号10~12に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

C) 以下 (e) または (f) のポリペプチドからなるH鎖可変領域と、(g) または (h) のポリペプチドからなるL鎖可変領域とを含む上記A) またはB) に記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ

、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

(g) 配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ

5 、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

D) 以下(e)または(f)のポリペプチドからなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体(ヒト抗ヒトIL-18抗体)のH鎖可変領域断片。

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

10 (f) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

E) 以下(g)または(h)のポリペプチドからなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体(ヒト抗ヒトIL-18抗体)のL鎖可変領域断片。

(g) 配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

20 F) 上記B)に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または上記D)に記載のH鎖可変領域断片と、上記B)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または上記E)に記載のL鎖可変領域断片とを連結してなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体の1本鎖可変領域断片。

25 G) 上記B)に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または上記D)に記載のH鎖可変領域断片、および／または、上記B)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または上記E)に記載のL鎖可変領域断片に、ヒト由来の定常領域を連結してなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体(ヒト抗ヒトIL-18抗体)またはその断片。

H) 上記抗体の断片が、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c A b、または s c F v F c である上記 G) に記載の抗体の断片。

I) 上記 A) ~ H) のいずれかに記載の抗体またはその断片に、修飾剤が結合されてなる修飾抗体。

5 J) 上記 A) ~ H) のいずれかに記載の抗体またはその断片をコードする遺伝子。

K) 配列番号 1 または 7 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する上記 J) に記載の遺伝子。

L) 上記 J) または K) に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

10 M) 上記 J) または K) に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

N) 上記 J) または K) に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト由来のヒト抗ヒトインターロイキン-18 抗体またはその断片を生産する方法。

15 O) 上記 A) ~ H) のいずれかに記載の抗体またはその断片、または上記 I) に記載の修飾抗体を用いたヒトインターロイキン-18 検出器具。

P) 上記 A) ~ H) のいずれかに記載の抗体またはその断片、または上記 I) に記載の修飾抗体を含むヒトインターロイキン-18 検出試薬を用いて、被検試料中のヒトインターロイキン-18 量を測定する免疫疾患の診断キット。

20 Q) 上記 P) に記載の検出試薬を用いて測定した被検試料中のヒトインターロイキン-18 量に基づいて免疫疾患を診断する方法。

R) ヒトインターロイキン-18 アンタゴニストを有効成分とするヒトインターロイキン 18 活性阻害剤。

S) 上記ヒトインターロイキン-18 アンタゴニストが、以下のいずれかの物質である上記 R) に記載のヒトインターロイキン 18 活性阻害剤。

25 以下のいずれかの物質を含むヒトインターロイキン-18 活性阻害剤。

i) 上記 A) ~ C) のいずれかに記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18 抗体

ii) 上記 D) ~ H) のいずれかに記載の抗体の断片

iii) 上記 I) に記載の修飾抗体

iv) 上記 i) ~ iii) のいずれかに記載の抗体、抗体の断片、または修飾抗体が認識

するヒトインターロイキン-18上の抗原決定領域に基づいて分子設計された低分子化合物。

T) 上記J) またはK) に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

5 U) 上記R) またはS) に記載のヒトインターロイキン-18活性阻害剤、または上記T) に記載の遺伝子治療剤を含む免疫疾患治療剤。

V) 上記U) に記載の免疫疾患治療剤を投与することによる免疫疾患の治療方法。

10 W) 抗原とヒトインターロイキン-18とによる刺激によってヘルパーT1細胞から産生するサイトカインを阻害することを特徴とする上記U) に記載の免疫疾患治療剤。

X) ヒトIL-18が関与するアレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患に適用するものであることを特徴とする上記U) またはW) に記載の免疫疾患治療剤。

15 本発明によれば、これまでのようにキメラ抗体またはヒト化抗体ではなく、ヒト由来のヒトIL-18に対する抗体およびその断片、並びにそれらの利用方法を提供できる。それゆえ、ヒトIL-18が直接または間接的に関与する疾病の治療において、反復投与や長期投与を行っても、顕著な治療効果と高い安全性とを維持した治療薬を提供できる。

20 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1において分離したクローンscFvのヒトIL-18に対する特異性をELISAによって評価した結果を示すグラフである。

25 図2は、実施例1において精製したヒト由来のscFvのヒトIL-18に対する特異性をELISAによって評価した結果を示すグラフである。

図3は、実施例1におけるscFv(h18-40、h18-108)が、IL-18によるヒト骨髓単核球KG-1細胞からのINF- γ の産生を阻害することを示すグラフである。

図4は、実施例1におけるs c F v (h 1 8 - 1 0 8) が、I L - 1 8 のヒト骨髄単核球K G - 1 細胞への結合を阻害することを示すグラフである。

図5は、図4において、s c F v (コントロール) の結果を示すグラフである。

5 図6は、s c F v (h 1 8 - 1 0 8) のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

図7は、s c F v (h 1 8 - 1 0 8) のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示すグラフである。

10 図8は、実施例2における、T h 1 細胞およびT h 2 細胞の刺激により、各細胞から産生されたサイトカインの量を示すグラフである。

図9は、実施例2における、T h 1 細胞およびT h 2 細胞の刺激により、各細胞の表面のI L - 1 8 R α 鎖の発現レベルを示す図である。

図10は、実施例2における、I L - 1 8 の用量と、T h 1 細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。

15 図11は、実施例2における、T h 1 細胞への刺激後の培養時間と、T h 1 細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。

図12は、実施例2において、I L - 1 8 刺激を受けたT h 1 細胞における、細胞質I F N - γ および/またはI L - 1 3 に陽性のC D 4 ⁺ T 細胞の割合を、F A C S 分析した結果を示す図である。

20 図13は、実施例2における、抗C D 3 抗体刺激を受けたT h 1 細胞中の、I F N - γ ⁺ T h 1 細胞の割合と、I F N - γ ⁺ T h 1 細胞の陽性選別例とを示す図である。

図14は、実施例2における、I F N - γ ⁺ T h 1 細胞を、抗C D 3 とI L - 1 8 とにより刺激した場合の、サイトカインの産生量を示すグラフである。

25

発明を実施する最良の形態

本発明の具体的態様について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

(1) 本発明の抗体およびその断片

本発明者は、ヒトインターロイキン-18 (IL-18) に対するヒト抗ヒト IL-18 抗体について検討した結果、ファージディスプレイ法によって得られたヒト由来の1本鎖可変領域断片 (scFv) が、ヒト IL-18 により誘導されるシグナル伝達および INF- γ 産生を阻害することを明らかにした。さらに、この1本鎖可変領域断片 (scFv) における、相補性決定領域 (CDR)、H鎖およびL鎖の可変領域のアミノ酸配列およびそれらをコードする遺伝子の塩基配列を同定した。

配列番号3には、V_H鎖のアミノ酸配列が示される。配列番号4~6は、このV_H鎖における相補性決定領域 (CDR1~3) のアミノ酸配列が示される。すなわち、配列番号3に示すV_H鎖のアミノ酸配列において、31番目~35番目のアミノ酸配列がCDR1 (配列番号4)、50番目~66番目のアミノ酸配列がCDR2 (配列番号5)、99番目~108番目のアミノ酸配列がCDR3 (配列番号6) に対応している。

一方、配列番号9は、V_L鎖のアミノ酸配列を示している。配列番号10~12は、このV_L鎖における相補性決定領域 (CDR1~3) のアミノ酸配列を示している33番目のアミノ酸配列がCDR1 (配列番号10)、49番目~55番目のアミノ酸配列がCDR2 (配列番号11)、88番目~98番目のアミノ酸配列がCDR3 (配列番号6) に対応している。

本発明の抗体およびその断片は、上記V_H鎖およびV_L鎖、並びにそれらのCDRとして、配列番号3~6および9~12に示される配列に限定されるものではなく、それらの一部が改変された変異ポリペプチドであってもよい。

すなわち、V_H鎖のCDRとしては、(a) 配列番号4~6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、(b) 配列番号4~6に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18 に対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド、も含まれる。

一方、V_L鎖のCDRとしては、(c) 配列番号10~12に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、(d) 配列番号10~12に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、お

よび／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド、も含まれる。

また、V_H鎖可変領域は、(e)配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、(f)配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド、も含まれる。

同様に、V_H鎖可変領域は、(g)配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、(h)配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド、も含まれる。

ここで、上記「1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、及び／又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されることを意味する。したがって、例えば、上記(b)のポリペプチドは、上記(a)のポリペプチドの変異ペプチドであり、ここにいる「変異」は、主として公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然(例えばヒト)に存在する同様の変異ポリペプチドを単離精製したものであってもよい。

なお、上記「変異」は、後述のように本発明の抗体またはその断片を、治療薬として利用する場合(ヒトに投与する場合)には、ヒト由来の構造またはヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検出器具や診断キットなどとして利用する場合(ヒトに投与しない場合)には、特に制限されない。また、本発明の抗体またはその断片を、ヒトに投与する場合、抗原を認識するCDRの高次構造を維持する範囲で、変異を行うことが好ましい。

また、本発明に係る抗体およびその断片は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、HisやMyc、Flag等によって本発明のタンパク質がエピトープ標識されるよう

な場合が挙げられる。

なお、CDRは抗原を認識する領域であるため、ヒトIL-18は、本発明にかかる抗体またはその断片の相補性決定領域（CDR）に認識される。したがって、少なくとも上記CDRを有する抗体は、ヒトIL-18を特異的に認識できる。すなわち、上記V_H鎖およびV_L鎖は、少なくとも前記V_H鎖およびV_L鎖のCDRを含んでいればよく、それ以外は、ヒト由来のV_H鎖およびL鎖のアミノ酸配列であればよい。これにより、ヒトIL-18に対する特異性は保持される。ただし、CDRは、H鎖およびL鎖の可変領域の1次構造と高次構造とによって、特異的に構築されている。このため、少なくとも前記V_H鎖およびV_L鎖のCDRを含み、それ以外を、ヒト由来のV_H鎖およびL鎖からヒト抗IL-18抗体を構成する場合、ヒトIL-18に対する特異性を有する抗体とすることが可能である。例えば、少なくともCDRの高次構造を維持することによって、ヒトIL-18に対する特異性を有する抗体とすることが可能である。

より具体的には、本発明にかかる抗体およびその断片としては、ヒト由来のものであって、例えば、以下に示すイ)～ニ)に示すものが挙げられる。

イ) 上記(a)または(b)に記載のH鎖の相補性決定領域を含むV_H鎖、

ロ) 上記(e)または(f)のポリペプチドからなるV_H鎖、

ハ) 上記(c)または(d)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むV_L鎖、

ニ) (g)または(h)のポリペプチドからなるV_L鎖、

ホ) 上記イ)またはロ)のV_H鎖および上記ハ)またはニ)のV_L鎖とを連結してなる1本鎖可変領域断片(scFv)、

ヘ) 上記イ)またはロ)のV_H鎖および/または上記ハ)またはニ)V_L鎖にヒト由来の定常領域を連結してなる断片などであってもよい。

上記ホ)およびヘ)において、上記V_H鎖とV_L鎖とを連結する場合、通常、適当なペプチドリンカーなどによって連結される。このペプチドリンカーとしては、例えば、10～25アミノ酸残基からなる任意の1本鎖ペプチドが用いられる。

また、上記ヘ)に記載の上記V_H鎖および/またはV_L鎖にヒト由来の定常領域を連結してなる断片(フラグメント)は、Fab、Fab'、F(a'b')₂

や、少なくとも一部のFc部を有したscAb、またはscFvFc、さらには完全抗体であってもよい。なお、scAbとはscFvにL鎖またはH鎖の定常領域の一部のドメイン（CDメイン）が結合したものの、scFvFcとはscFvにH鎖およびL鎖の全定常領域が結合したものである。

5 さらに、本発明の抗体およびその断片には、安定性や抗体価を向上させるために、修飾剤が結合されていてもよい。すなわち、本発明の抗体およびその断片は、修飾抗体であってもよい。この修飾剤としては、例えば、糖鎖や高分子などが挙げられる。糖鎖修飾を行った場合には、その糖鎖が何らかの生理活性を有する可能性があるが、ポリエチレングリコール（PEG）などの単純な高分子修飾を行
10 った場合にはそれ自体生理活性を示さない。さらに、PEG化によって肝臓での吸収を抑制したり、血中での安定性を向上したりする可能性がある。つまり、修飾剤としては、PEGなどの単純高分子が好ましい。

 なお、本発明の抗体およびその断片の修飾剤による修飾は、前述の変異ペプチドの作製と同様に、治療薬として利用する場合には、ヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検出器具や診断キットなどとして利用する場合には、特に制限され
15 ない。また、本発明の抗体またはその断片を、ヒトに投与する場合、抗原を認識するCDRの高次構造を維持する範囲で、修飾することが好ましい。

 また、上記抗体は、抗体と構造的に関連したタンパク質も包含する意味、すなわち免疫グロブリンの意味である。さらに、本発明の抗体は、IgA、IgD、
20 IgE、IgG、IgMの何れのクラスでもよい。言い換えると、単量体であってもよいし、2量体、3量体、4量体、5量体といった多量体であってもよい。

 後述する実施例に示すように、上記scFvについて詳細な解析を進めた結果、後の実施例において詳述するように、その作用・性質について以下の知見が得られた。

25 〔1〕ヒトIL-18と特異的に結合する。

 〔2〕ヒトIL-18により誘導されるシグナル伝達およびINF- γ の産生を阻害する。

 このように、上記scFvは、ヒト由来のアミノ酸配列を有しているため、抗体の活性を阻止する阻止抗体が形成される可能性は極めて低い。さらに、ヒトI

5 IL-18と強く結合することにより、その生理活性を阻害する作用があるので、ヒトIL-18によって惹起される種々の免疫応答を阻害することができる。よって、上記scFvおよびそれを含む抗体またはその断片は、ヒトIL-18が直接または間接的に関与する疾患、例えば、この免疫応答によって惹起されるアレルギー、炎症、および慢性免疫異常疾患の治療のために利用することができる。このような治療薬が開発されれば、ヒトIL-18が関与する疾患の新しい治療方法の確立が期待される。

(2) 本発明にかかる遺伝子

10 本発明にかかる遺伝子は、上記(1)で説明した抗体またはその断片をコードする遺伝子であり、配列番号1または7に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)領域として有する遺伝子、およびその塩基配列の一部を改変した改変遺伝子などが含まれる。

15 上記の遺伝子は、本発明の抗体またはその断片をコードしているので、適当な宿主(例えば細菌、酵母)に導入して、本発明の抗体またはその断片を発現させることができる。

20 さらに、上記「遺伝子」は、上記(1)の抗体またはその断片をコードする配列以外に、非翻訳領域(UTR)の配列やベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。例えば、配列番号1または7に記載の配列をベクター配列につないで本発明の遺伝子を構成し、これを適当な宿主で増幅させることにより、本発明の遺伝子を所望に増幅させることができる。また、本発明の遺伝子の一部配列をプローブに用いてもよい。また、後述するように、本発明の遺伝子は、ヒトIL-18が関与する疾患用の遺伝子治療剤(遺伝子治療薬)として利用できる。

(3) 本発明の抗体およびその断片の取得方法・生産方法

25 上記(1)に記載の抗体およびその断片は、例えば、後述する実施例に示すように、いわゆるファージディスプレイ法を利用することにより、取得することができる。また、上記(1)に記載の抗体およびその断片は、上記(2)に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、生産することができる。なお、抗体およびその断片の取得方法および生産方法は、これに限定されるものではない。

より具体的には、健常人の末梢血Bリンパ球からmRNAを抽出し、免疫グロブリン遺伝子の V_H 鎖、 V_L 鎖を、その両端を規定するプライマー対を用いてRT-PCR法により増幅し、多様な配列を有するH鎖、L鎖のV領域集団を得る。次に、更にペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅して、H鎖、L鎖のV領域のランダムな組み合わせによる多様なscFv DNA集団を調製する。得られたscFv DNAをファージミドベクターpCANTAB5Eに組み込み、scFvディスプレイファージライブラリを作製する。このライブラリをプラスチックチューブに固相化したヒトIL-18と反応させ、洗浄により未反応のscFvディスプレイファージを除去した後に、ヒトIL-18と結合しているscFvファージクローンを酸で溶出する。分離したファージクローンからscFv DNAを調製し、これを発現ベクターに組み込み、該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って培養して目的のscFv蛋白のみを得るというものである。

なお、配列番号1および7は、ファージディスプレイ抗体法によって、取得したヒトIL-18に対する1本鎖可変領域(scFv)の V_H 鎖および V_L 鎖をコードするcDNAの塩基配列である。

scFv DNAの発現方法としては、例えば、大腸菌で発現させることができる。大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列等、発現させるscFvを機能的に結合させて発現させることが出来る。例えば、プロモーターとしては、lacZ プロモーター、araB プロモーター等を挙げることができる。scFvの分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに発現させる場合、pelB シグナル配列(Lei, SP., et al, J. Bacteriol., 1987, 169 : 4379-4383)を用いるとよい。培養上清中に分泌させるにはM13 ファージのg3蛋白のシグナル配列を用いることもできる。

前記のように発現されたscFvは細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本願発明で発現されるscFvは、そのC末端にE tag 配列が付加されているので、抗E tag 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、容易に短時間で精製することができる。その他、通常のタンパク質

で使用されている分離、精製方法を組み合わせて精製することも可能である。例えば、限外濾過、塩析、ゲル濾過／イオン交換／疎水クロマト等のカラムクロマトグラフィーを組み合わせれば抗体を分離・精製することができる。

このようにして得られた s c F v 蛋白（ポリペプチド）は、後述する実施例に示すようにヒト IL-18 に対する結合活性を有することが明らかになった。本発明のヒト抗ヒト IL-18 抗体の抗原結合活性を測定する方法としては、E L I S A、BIAcore 等の方法がある。例えば E L I S A を用いる場合、ヒト IL-18 を固相化した 96 穴プレートに目的の抗 IL-18 抗体や抗体フラグメントを含む試料、例えば大腸菌の培養上清や精製抗体を加える。次にアルカリホスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、発色基質パラニトロフェニルホスフェートを加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することが出来る。

さらにまた、本願発明により得られた s c F v 蛋白は、ヒト IL-18 により誘導されるヒト骨髓単核球 KG-1 細胞からの IFN- γ 産生を容量依存的に抑制することも明らかとなった。

従って、この s c F v 蛋白は、ヒト IL-18 の生物活性を抑制する事から、IL-18 の作用により惹起される疾患の予防または治療に有効であると期待される。

（４）本発明の組換え発現ベクター等

本発明の組換え発現ベクターは、前記（２）の遺伝子、すなわち、上記（１）の抗体またはその断片をコードする遺伝子を含むものであり、例えば、配列番号 1 又は 7 に示される何れかの塩基配列を有する c D N A が挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを用いることができるが特に限定されるものではない。

このように、組換え発現ベクターは、本発明の遺伝子を含むものである。ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明に係る遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。

本発明の遺伝子が宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認するために、各種マーカーを用いてもよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと本発明の遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。あるいは、本発明に係る抗体またはその断片を融合タンパク質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質GFP (Green Fluorescent Protein) をマーカーとして用い、本発明に係る抗体またはその断片をGFP融合タンパク質として発現させてもよい。

上記宿主細胞は、特に限定されるものではなく、従来公知の各種細胞を好適に用いることができる。具体的には、上記(2) 遺伝子が全長DNAの場合の宿主細胞としては、ヒト又はマウス由来の細胞をはじめとして、線虫 *Caenorhabditis elegans*、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞、各種哺乳動物 (ラット、ウサギ、ブタ、サル等) の培養細胞、あるいは、キイロショウジョウバエ、カイコガ等の昆虫の培養細胞等などの動物細胞が挙げられ、DNAフラグメントの場合の宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*) などを挙げることもできるが、特に限定されるものではない。

上記発現ベクターを宿主細胞に導入する方法、すなわち形質転換方法も特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

本発明の形質転換体は、前記(2) の遺伝子、すなわち、上記(1) の抗体またはその断片をコードする遺伝子が導入された形質転換体である。ここで、「遺伝子が導入された」とは、公知の遺伝子工学的手法 (遺伝子操作技術) により、対象細胞 (宿主細胞) 内に発現可能に導入されることを意味する。また、上記「形質転換体」とは、細胞・組織・器官のみならず、動物個体を含む意味である。対象となる動物は、特に限定されるものではないが、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどの哺乳動

物が例示される。特に、マウスやラット等の齧歯目動物は、実験動物・病態モデル動物として広く用いられており、なかでも近交系が多数作出されており、受精卵の培養、体外受精等の技術が整っているマウスが実験動物・病態モデル動物として好ましく、ノックアウトマウス等は、上記抗体やその断片の更なる機能解析、ヒトIL-18が関与する病気の診断方法の開発や、その治療方法の開発などに有用である。

なお、上記(1)の抗体またはその断片は、本発明の組換え発現ベクターを用いて作製した、本発明の形質転換体によっても生産することが可能である。

(5) 本発明の抗体およびその断片の利用方法

(5-1) ヒトIL-18検出器具・免疫疾患の診断キット・診断方法

上記(1)の抗体、その抗体断片、または修飾抗体は、ヒトIL-18に対して、特異的に強く結合するため、ヒトIL-18の検出・測定などに利用できる可能性がある。すなわち、上記ヒトインターロイキン-18検出器具によれば、例えば、血液や尿などの試料中に含まれるヒトIL-18を高精度に検出できる。それゆえ、ヒトIL-18が関与する疾患の判定や治療効果の評価を行うための診断用、治療用として利用できる。

なお、本発明のヒトIL-18検出器具は、本発明の抗体における少なくともCDRのアミノ酸配列を用いればよい。ヒトIL-18検出器具は、種々の条件下でのIL-18の検出・測定などに利用できる。本発明のヒトIL-18検出器具としては、例えば、ヒトIL-18と特異的に結合する本発明の抗体またはその断片を基盤(担体)上に固定化した抗体チップや抗体カラム等が挙げられる。

また、本発明の抗体またはその断片は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによるヒトIL-18の精製にも極めて有用である。この精製方法は、本発明の抗体またはその断片をヒトIL-18とそれ以外の物質の混合物に接触させて抗体またはその断片にヒトIL-18を吸着させる工程と、吸着したヒトIL-18を抗体またはその断片から脱着させ、採取する工程を含むものである。この精製方法によれば、IL-18を短時間かつ高精度に精製できる。

本発明の抗体またはその断片、およびそれらの修飾抗体は、ヒトIL-18を

検出するための試薬（ヒト I L - 1 8 検出試薬）としても広範な用途を有する。すなわち、これらの抗体またはその断片によるラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイを適用するときには、被検試料中のヒト I L - 1 8 を迅速且つ正確に定性又は定量分析することができる。この標識イムノアッセイでは、上記抗体またはその断片は、例えば、放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識して用いられる。また、これらの抗体およびその断片は、ヒト I L - 1 8 に特異的に反応し、免疫反応を呈するので、その免疫反応を標識物質を指標に測定すれば、被検試料中のごく微量のヒト I L - 1 8 を精度良く検出することができる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。

本発明の免疫疾患の診断キット、および免疫疾患を診断する方法は、このようなヒト I L - 1 8 の検出方法に従い、被検試料（血液や体液、組織など）中のヒト I L - 1 8 量を測定し、その測定結果に応じて免疫疾患の診断を行うものである。なお、上記「免疫疾患」は、ヒト I L - 1 8 が関与する疾患であり、例えば、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（AHR）、喘息などが例示される。

このように、本発明のヒト I L - 1 8 の検出器具による検出方法は、ヒト I L - 1 8 を製造する際の工程管理や製品の品質管理に有用である。また、本発明の免疫疾患の診断キットおよび診断方法は、組織や体液におけるヒト I L - 1 8 のレベルを指標とする種々の感受性疾患の診断や、各種免疫疾患の治療評価を行うために極めて有用である。

なお、一般に診断用に用いる抗体は、マウス、ウサギ、ヤギなどのヒト以外の動物を免疫して作成される。しかし、動物の免疫系では、自己の体を構成する分子に結合する抗体を産生するリンパ球は、排除または不活性化される。つまり、動物を免疫して作成した抗ヒト I L - 1 8 抗体のうち、ヒト I L - 1 8 と動物の I L - 1 8 とで酷似した部分を抗原決定領域とした抗体は含まれない。

これに対し、本発明の抗体は、ヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体を提示させたフー

ジライブラリーからスクリーニングされた抗体である。このフェージには、動物のように抗体を排除または不活性化する機構は存在しない。それゆえ、本発明の抗体には動物の免疫では作製できない、ヒト、サル、その他各種の動物の I L - 1 8 に共通した抗原決定領域に結合特異性を示す抗 I L - 1 8 抗体が含まれる。

- 5 このような抗体を本発明の検出器具や診断キットに用いれば、ヒトのみならずサルをはじめとする各種動物疾患モデルにおける I L - 1 8 関連疾患を診断することができる。

(5-2) ヒト I L - 1 8 活性阻害剤など

- 10 上記(1)の抗体は、ヒト I L - 1 8 を特異的に認識するヒト由来のヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体である。さらに、この抗体は、ヒト I L - 1 8 に特異的に結合するとともに、ヒト I L - 1 8 の受容体への結合を阻害してこの受容体を介したシグナル伝達も阻害し、さらには、ヒト I L - 1 8 によって誘導される I F N - γ の産生も阻害する。

- 15 したがって、この抗体は、言い換えれば、ヒト I L - 1 8 アンタゴニストである。そして、このヒト I L - 1 8 アンタゴニストは、ヒトインターロイキン-18 活性阻害剤として利用することができる。

上記「ヒト I L - 1 8 アンタゴニスト」としては、特に限定されるものではないが、例えば、以下の i) ~ iv) の物質が挙げられる。

- 20 i) 上記(1)に記載の本発明の抗体。
ii) 上記(1)に記載の本発明の抗体の断片。
iii) 上記(1)に記載の本発明の抗体またはその断片の修飾抗体。
iv) i) ~ iii) に記載の抗体、抗体の断片、または修飾抗体が認識するヒト I L - 1 8 上の抗原決定領域に基づいて分子設計された低分子化合物。

- 25 ここで、上記「ヒトインターロイキン-18 活性阻害剤」は、ヒトインターロイキン-18 の活性を抑制するのはもちろん、ヒトインターロイキン-18 の受容体への結合も拮抗的に阻害するもの、さらには、ヒト I L - 1 8 と I L - 1 8 受容体との複合体に結合して、シグナル伝達を阻害するものであってもよい。

また、上記(2)に記載の本発明の遺伝子は、ヒト I L - 1 8 が関与する免疫疾患における遺伝子治療剤として利用することができる。この遺伝子治療剤を撰

取すれば、体内で本発明の抗体またはその断片が形成されるので、上記ヒト IL-18 活性抑制剤と同様の効果が得られる。なお、ヒト抗 IL-18 抗体が、生体内で形成され続けると、ヒト IL-18 の作用を過剰に抑制してしまうが、ヒトの場合、IL-18 が欠失したとしても、IL-1 が IL-18 と同様の作用を示すため、特に問題は生じない。

本発明の抗体は、ヒト IL-18 を特異的に認識するヒト由来のヒト抗ヒト IL-18 である。すなわち、この抗体のアミノ酸配列は、従来のキメラ抗体やヒト化抗体とは異なり、すべてヒト由来である。

したがって、本発明の抗体の作用を阻止する抗体（阻止抗体）が形成される虞はない。それゆえ、たとえ、この抗体を反復投与または長期投与したとしても、高い安全性を保持したまま、効果も持続することが可能である。

それゆえ、本発明のヒト IL-18 活性阻害剤および遺伝子治療剤は、ヒト IL-18 が関与する免疫疾患の治療法として有用な免疫疾患治療剤（免疫治療薬）として利用可能である。

なお、本発明の免疫疾患治療剤は、体内でその効果を発揮すればよいので、例えば、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（またはこれを含むヒト IL-18 活性阻害剤）を投与してもよいし、プロドラッグ化して体内で代謝されて当該ポリペプチドが発現されてもよい。すなわち、本発明の免疫疾患治療剤は、上記 i)～iv) のヒト IL-18 アンタゴニスト（ヒト IL-18 活性阻害剤）または上記遺伝子治療剤がプロドラッグ化されていてもよい。すなわち、体内で、活性代謝物となるように、免疫治療薬剤を修飾してもよい。

また、本発明の免疫疾患治療薬剤には、1 種類以上の賦形剤、1 種類以上の結合剤、1 種類以上の崩壊剤、1 種類以上の滑沢剤、1 種類以上の緩衝剤などのように、医薬品として許容される添加物が含まれていてもよい。

以上のように、本発明の抗体（ヒトモノクローナル抗体）及び、当該抗体フラグメント分子は、ヒト由来抗ヒト IL-18 抗体の可変領域を有し、ヒト IL-18 と強く反応して、IL-18 と IL-18 受容体間の結合に阻害作用を示す。さらに、IL-18 によって惹起される種々の免疫応答を阻害することができ、当該免疫応答により惹起されるアレルギー、炎症及び免疫異常性疾患の予防または治療薬、例えば、

抗炎症剤あるいは自己免疫疾患の治療及び予防のための薬剤として使用することができる。

また、本願発明のヒト IL-18 に対するヒト由来 s c F v は、IL-18 と特異的に結合し、IL-18 により誘導されるシグナル伝達及び IFN- γ 産生を阻害するものであることが示された。従って、当該 s c F v 及び s c F v の V_H鎖及び V_L鎖をヒト定常領域またはその一部と結合させたヒト抗ヒト IL-18 抗体またはその抗体フラグメントは、IL-18 の関与する疾患、例えば慢性炎症性疾患や自己免疫疾患等の治療への適用が期待される。また、IL-18 とは結合するが抑制作用を示さなかった抗体を含めてこれらの抗体で、IL-18 の血中濃度を測定し、病態の症状の変動をモニターすることもできる。

なお、前述のように本発明の抗体は、IL-18 に対するシグナル伝達及び IFN- γ 産生を阻害するので、そのような特性を有する抗体とヒト IL-18 との結合特異性を示す IL-18 上の抗原決定領域を明らかにすれば、低分子化合物の免疫疾患治療薬の開発への応用が可能となる。この抗原決定領域を、エピトープという。このエピトープは、アミノ酸の 1 次配列そのものである場合や、もしくは、ペプチド鎖の折り畳まれ方で構築した立体構造である場合がある。いずれの場合でも、例えば、本発明者等が提案した「モノクローナル抗体を用いた分子鑄型デザイン法」によって、エピトープの類似化合物（ミミック分子）をデザインすることができる（T. Fukumoto et al., Nature Biotechnology, 16:267-270, 1998.）。ここで、「低分子化合物」とは、例えば、ペプチドや抗体などの比較的分子量の大きい化合物（分子量 1 万以上）のものではなく、一般に低分子医薬として用いられている、分子量 1 万未満、好ましくは、分子量 3000 未満の化合物を示している。なお、低分子化合物の分子量は、小さいほど好ましい。

なお、上記低分子化合物として、ペプチドやさらに低分子量の化合物を創製する場合、このミミック分子の分子構造に着目して分子設計を行う、いわゆる in sillico プロセスによって、設計することができる。このように、in sillico による分子設計を行うことにより、安価かつ迅速に、治療薬となりうる低分子化合物を、リード化合物として選抜できる。

具体的には、例えば、後述の実施例では、ヒト抗ヒト IL-18 s c F v 抗体

のCDRは、配列番号4～6，10～12に示されている。一般に、抗体において、CDRは、抗原を認識する領域（部位）である。すなわち、CDRは、抗体の活性中心となる。つまり、実施例1に示したscFvは、CDRによって、ヒトIL-18を特異的に認識する。従って、このCDRの高次構造と略一致（好ましくは完全に一致）するように、低分子化合物を設計すれば、その低分子化合物は、低分子医薬品として利用できる。言い換えれば、低分子化合物は、CDRのコンフォメーションに近づくように設計する。なお、in silico プロセスの方法は、特に限定されるものではないが、例えば、SBDD (Structure Based Drug Design), CADD (Computer-Aided Drug Design) などにより、CDRが有する官能基や、CDRの高次構造に基づいて、コンピュータ上で設計できる。

このようにして設計した低分子化合物は、抗体のようなタンパク質（ペプチド）に比べて、安定性が高い。このため、この低分子化合物は、取り扱いやすい医薬品として利用できる。

（5-3）免疫疾患治療薬剤の適用例-1

前述のように、本発明のヒトIL-18活性阻害剤および遺伝子治療剤は、ヒトIL-18が関与する免疫疾患の治療法として有用な免疫疾患治療薬剤となる。ここで、免疫疾患治療薬剤の適用例について説明する。

Th1細胞優位な免疫応答は、一般に、自己免疫疾患の病態に検討される。しかし、Th1細胞優位な免疫応答は、Th2細胞が関与する疾患（喘息・アトピーなど）に対して、防御的である。しかしながら、最近の研究で、Th1細胞が、Th2細胞が関与する気道過敏を増大させることに関与することが明らかとなった。さらに、Th1細胞が、好中球の増加と活性化によって、気道過敏性（AHR）を誘導することが示された。

実際、喘息患者の気道は、好中球数の増加だけでなく、IFN- γ ，TNF α ，およびIL-8レベルの増加も見られる場合がある。それにもかかわらず、どのようにTh1細胞がTh2細胞の影響を妨げ、病態を示すのか、そのメカニズムは、未だ解明されていない。従って、気道炎症および気道過敏性が誘導された場合の、Th1細胞の病態への関与を解明することは重要である。

IL-18は、本来は、抗CD3抗体およびIL-12存在下、Th1細胞か

ら産生するIFN- γ を増加させる因子として、発見された。このため、IL-12とIL-18との混合物を注入すると、in vivo でIFN- γ 産生細胞を誘導して、Th2細胞が誘導するIgE応答を阻害する。しかしながら、本発明者等の最近の研究によつて、in vitro で誘導した抗原特異的Th1細胞あるいはTh2細胞を、ナイーブホストマウス（非感作性ホストマウス）に受動移入後、ホストマウスを約1ヶ月間、無処置で放置しておく、移入した各細胞が、メモリー表現型のTh1細胞あるいはTh2細胞となること、および、これらの細胞を、経鼻的に投与した抗原、または、抗原とIL-18とにより刺激された場合に、ホスト動物が、気道炎症を発症することが明らかとなった（T. Sugimoto et.al., J. EXP. Med., 2004, 199, 535-545.）。従来の報告は、IL-13の中和は、Th2細胞が移入されたマウスの、好酸球の増加とAHRとを阻害するというものであった。これに対し、同様の処理をしたTh1細胞が移入されたマウスでは、たとえ、この処理が、著しく気道の好酸球の増加を減少させるものであっても、AHRが阻害されない。

これらの結果は、Th1細胞が、Th2細胞とは全く異なる様式で、AHRを誘導することを示唆している。Th1細胞は、抗原とIL-18とによる刺激に対して、ユニークな応答を示し、Th1サイトカイン（IFN- γ ）、Th2サイトカイン（IL-9、IL-13）、ケモカイン（RANTES、MIP-1 α （マクロファージ由来炎症性タンパク質-1 α ）、およびGM-CSFを産生する。Th2サイトカインとGM-CSFは、主に、気管支喘息を誘導する因子として、広く認められている。いくつかの研究から、Th1細胞とTh2細胞とは互いに阻害しあうものではなく、むしろ共同することで、気管支喘息の発症を誘導するとともに、その症状を増幅することが示唆されている。実際、IFN- γ とIL-13との同時投与は、最も重篤な気管支喘息を誘導する。本発明者等が見出したTh1細胞の新規機能は、抗原とIL-18とで刺激を受けると、Th1サイトカイン、Th2サイトカイン、GM-CSFおよびケモカインを産生することにより、様々な炎症性病態を誘導することである。

従つて、ヒトTh1細胞も、同条件下で、病態を示す可能性がある。

後述の実施例2では、ヒトTh1細胞が、抗原とIL-18存在下で、Th1

サイトカイン、Th 2 サイトカイン、GM-CSF およびケモカインを産生することが確認された。この実施例では、新たに誘導された IL-18R α を強く発現する Th 1 細胞が、抗 CD 3 抗体と IL-18 とによる刺激によって、IFN- γ 、IL-13、GM-CSF、および IL-8 の産生を著しく増加させることが示された。この結果は、Th 1 細胞が、Th 1 サイトカイン、Th 2 サイトカインだけでなく、GM-CSF、IL-8 の産生により、組織の損傷を誘導する可能性を示している。

このように、IL-18 は、抗原と共同して Th 1 細胞を刺激することにより、重篤な気道炎症および AHR を発症する。従って、例えば、前述したヒト IL-18 アンタゴニスト(前述の i)~iv)) は、その治療薬となる。

(5-4) 免疫疾患治療薬剤の適用例-2

次に、免疫疾患治療薬剤の別の適用例について説明する。

これまで、アトピー性皮膚炎は、アレルギー特異的 IgE 抗体依存性の獲得型アトピーとして考えられていた。このため、アレルギー特異的 IgE 抗体を標的とする、IgE 抗体阻害剤や、抗アレルギー剤などが、アトピー性皮膚炎の治療薬として用いられてきた。しかし、これらの治療薬では治癒できない、または、再燃を繰り返すアレルギー患者が、年々増加している。

従来のように、獲得型アトピー性皮膚炎 (IgE 抗体依存性アトピー性皮膚炎) を標準とした治療法では無効な、自然型アトピーの発症および重症度には、IL-18 が重要な役割を果たしている。

しかし、そのような症例に対する有効な治療法は、未だ確立されていない。

Th 2 細胞の機能に対し拮抗作用を示す Th 1 細胞を、CpG DNA 投与するなどの方法で誘導できるが、同時に誘導される IL-18 は Th 1 細胞に作用して、TH 1 型の気管支喘息を誘導することが問題となる。

獲得型アトピー性皮膚炎 (IgE 抗体依存性アトピー性皮膚炎) の治療法として、抗原特異的減感作療法が知られているが、その分子機構は、未だ解明されておらず、治療の有効性も低い。なお、減感作療法とは、IgE 抗体が関与する即時型アレルギー反応 (I 型アレルギー反応) の原因抗原であるアレルギー、特に吸入性アレルギーを生体内に投与し (一般には注射)、アレルギーに対する過敏

反応を軽減させようとする治療法である。

I g E 抗体の F c 部に特異的で、F c R 1 部への結合を阻害するヒト型マウス抗体が、Genentic 社で開発され、アレルギー治療薬として有効であることが報告されている (Milgrom H. et al., N. Engl. J. Med., 1999:341, 1966-73.)

5

また、Th 2 サイトカイン阻害剤は、抗 I L - 4 抗体、抗 I L - 5 抗体、抗 I L - 1 3 抗体、および、これらの受容体に対する抗体は、アレルギー治療薬としての抗体医薬 (医薬品) になり得ると考えられるが、未だ、有効な抗体医薬は開発されていない。

10 F K 5 0 6 に代表される低分子免疫抑制剤の低量使用は、抗アレルギー作用を発揮するが、副作用として、腎障害などが報告されている。

T L R (Toll Like Receptor) を介する刺激を加え、I L - 1 2 の産生を誘導する手段として、CpGDNA が注目されている。この CpGDNA は、非メチル化 CpG モチーフを有する DNA である。CpGDNA は、特に Th1 反応 (マクロファージを活性化する反応) を強く惹起し、臨床面での応用が期待されている分子である。しかし、CpGDNA は、前述のように、同時に誘導される I L - 1 8 は T h 1 細胞に作用して、T H 1 型の気管支喘息を誘導することが問題となる。

15

このように、アトピー性疾患は、これまで、アレルゲン特異的 I g E 依存性の獲得型のアトピー疾患として論じられ、それを照準とした I g E 阻害剤や抗アレルギー剤などが、治療薬として用いられている。しかし、これらの治療薬では、治癒しない、あるいは、再燃を繰り返す患者が年々増加している。

20

すなわち、従来の獲得型アトピーを照準とした治療法では、無効な自然型アトピーが存在しており、その発症には、I L - 1 8 が重要な役割を果たしている。

従来の免疫学の考え方では、T h 1 細胞誘導は、T h 2 細胞機能を抑制することによって、抗アレルギー作用を発揮するものと考えられてきた。しかし、本発明者等は、I L - 1 8 が、T h 1 細胞を in vivo 条件下で刺激することにより、I N F - γ , I L - 8, 9, 1 3 などを産生し、難知性の気管支喘息を誘導することを見出した。これは、アレルギー性炎症発症が、T h 1 と T h 2 とのバランスが原因であるという、従来の定説を覆すものである。つまり、従来のバランス

25

是正を目指す治療法を明確に否定するものである。

I L-4, 5, 9, 13は、重要なT h 2サイトカインである。一方、ロイコトリエン、ヒスタミン、セロトニンなどは、重要なケミカルメディエーターである。これらを個々に抑制（阻害）する技術はあっても、その上流から阻止するものではない。すなわち、各サイトカインに直接作用して、それらの機能を抑制（阻害）する技術はあっても、各サイトカインの産生を上流で、阻害する技術はない。I L-18は、上記各サイトカインの上流にあることから、I L-18の活性を阻害することによって、アレルギー性疾患（アレルギー性炎症）に有効であると考えられる。

アレルギー性疾患の発症メカニズムには、活性化T細胞、好塩基球、および肥満細胞が深く関与する。特に、アレルゲンによる肥満細胞または好塩基球上のFcεRに結合したIgE分子の架橋によって、これらの細胞が活性化される。その結果、T h 2サイトカインとケミカルメディエーターとが産生され、アレルギー性炎症（アレルギー性疾患）が誘導されると考えられている。しかし、アレルゲンやIgE関与がなく、感染を契機にアレルギー性炎症が誘導される場合がある。抗アレルギー剤、免疫抑制剤など、非特異的な治療法は存在するものの、I L-18を特異的に抑制する技術は開発されていない。

そして、これまで作製されている抗I L-18抗体は、マウス抗体をヒト化したものであるため、臨床応用できる抗体医薬にはなりえない。

本発明の抗体は、自然型アトピー（I L-18依存性疾患）を誘導するI L-18に対する、ヒト由来のヒト抗ヒトI L-18モノクローナル抗体（完全ヒト型抗体）である。これまで、ヒトI L-18に対する完全ヒト抗体は、開発されておらず、本発明の抗体が、国際的に唯一のものである。この抗体は、臨床適用しても、マウス抗体のように、抗原性を示さない。従って、この抗体は、副作用のない優れた抗体医薬として利用できる。これにより、アレルギー性疾患、自然型アトピー、および喘息などの新規な治療法を確立できる。例えば、この抗体は、従来型の獲得免疫系の異常に基づく獲得型アトピー（IgE依存性）を照準とした治療法では無効な、自然型アトピー（I L-18依存性）を標的とした新規な治療法と確立できる。

後述する実施例に示すように、この抗体は、種々の *in vitro* 系で、IL-18の活性を抑制した。特に、この抗体は、抗原とIL-18とによる刺激によって生じるTh1細胞からのTh1サイトカインとTh2サイトカインとの産生抑制機能を有している。この機能は、IL-12の作用を損なわない点で重要である。

従って、上記免疫疾患治療薬は、現在の難病の1つであるアレルギー性炎症の治療標的として、重要な役割を果たす。さらに、上記免疫疾患治療薬は、従来のアレルギー性炎症治療薬と全く異なる新しいタイプの治療薬を創製するために有用である。

以上のように、IL-18は、Th1細胞を刺激して、気管支喘息を誘導する。

また、IL-18は、樹状細胞、マクロファージなどの免疫系の細胞だけでなく、皮膚ケラチノサイト、腸管上皮細胞、気道上皮細胞など、種々の非免疫系の細胞からも産生する。

また、IL-18は、IL-12の存在下で、様々な免疫系または非免疫系の細胞から、IFN- γ の産生を誘導する。一方、IL-18は、IL-12の非存在下で、NKT細胞、T細胞、NK細胞から、IL-4、IL-13などのTh2サイトカイン（ヘルパーT2細胞から産生するサイトカイン）の産生を誘導して、抗原非特異的にIgE産生を誘導する。

また、IL-18は、抗原刺激を受けたTh1細胞を刺激して、Th1サイトカインに属するIFN- γ の産生を増強するばかりか、Th2サイトカインに属するIL-9、IL-13、さらに代表的なケモカインであるIL-8の産生を誘導する。

また、IL-18は、OVA特異的Th1型メモリーT細胞を移入したマウスに、経鼻的にOVAと共に投与する（IL-18とOVAとを投与）ことにより、肺胞と間質内への好中球・リンパ球・マクロファージ・好酸球の強い湿潤像と、気道過敏性とを特徴とするTh1型の気管支喘息を誘導できる。

また、IL-18は、抗原/IgE非依存的に、直接、肥満細胞や高塩基球を刺激する。その結果、様々なサイトカインや化学伝達物質の産生を誘導し、自然

型アトピー（IL-18依存性炎症）を誘導する。

Th2細胞依存性の喘息は、抗IL-5抗体、あるいは、抗IL-13抗体によって、抑制できる。しかし、抗原とIL-18とにより刺激されたTh1細胞が誘導する喘息に対しては、これらの抗体による治療は無効である。本発明の抗体は、上記の抗体では無効な喘息の治療に有効である。すなわち、本発明の抗体は、IL-18によって誘導される喘息（感染が原因で発症する喘息）に対して有効である。

本発明は、IL-18が関与する喘息病態の発見を含み、かつ、従来型の獲得免疫系の異常に基づく獲得型アトピー（IGE依存性）を標準とした治療法では無効な自然型アトピー（IL-18依存性）を標的とする新規な治療法を確立する上で重要となる。

また、本発明の抗体は、自然免疫系と獲得免疫系とを結合する上で重要な役割を果たすヒトIL-18に対するヒトIL-18モノクローナルヒト抗体（抗ヒトIL-18抗体）である。

この抗体は、従来型の獲得免疫系の異常に基づく獲得型アトピー（IGE依存性）を標準とした治療法では無効な自然型アトピー（IL-18依存性）を標的とした新しい治療法を提供するものである。

さらに、この抗体は、アトピー性皮膚炎疾患だけでなく、喘息や鼻炎、その他のアレルギー性疾患に対する新規な治療法を提供するものである。特に、IL-18は、Th1細胞を刺激して、難治性の気管支喘息を発症する。このため、気道上皮に感染して、気道上皮細胞からIL-18の産生を誘導する作用を示す病原体は、気管支喘息を発症する原因となる。従って、この抗体は、感染によって発症した喘息に対して有効な治療薬となる。

本発明にかかる抗体およびその断片は、ヒトIL-18の受容体への結合を阻害するヒト抗ヒトIL-18抗体およびその断片である。従って、ヒトIL-18が原因となる様々な炎症性疾患の治療薬（治療方法）または予防薬（予防方法）として利用可能である。

また、本発明は、例えば、後述の実施例に示した、scFv抗体のうち、CDRの高次構造に基づき、低分子化合物を設計することにより、IL-18依存の

低分子医薬品（化学合成薬剤）の開発に重要な手段を提供する。

本発明で得られたヒト抗 IL-18 抗体は、感染を契機に増悪するアトピー性皮膚炎、難知性の気管支喘息の治療に対して有効である。

5 本発明のヒト抗 IL-18 抗体は、アレルゲン/IgE を原因としない IL-18 依存性炎症（例えば、自然型アトピー）に対して新規な治療法を確立できる。

前述のように、本発明のヒト抗 IL-18 抗体は、IL-18 の受容体への結合を阻害する。従って、この抗体は、上記のような、IL-18 が原因となって発症する、様々な炎症性疾患の治療と予防に有効となる。

10 本発明では、ヒト 1 本鎖抗体 (scFv) を提示するファージディスプレイライブラリから、IL-18 に特異的に結合する scFv の単離に成功した。この 1 本鎖抗体も、IL-18 の受容体への結合を、特異的に阻害することが可能である。

15 以下、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例の記載に限定されるものではなく、本発明の範囲内で種々の変更が可能である。

〔実施例 1〕

(1-1) 健常者からのファージライブラリーの構築

20 ファージライブラリーの構築は、J. D. Marks ら (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) により報告されている方法を参考に、健常者 20 名の末梢血由来リンパ球を出発材料として行った。構築した $V_{H(Y)}-V_K$ 、 $V_{H(Y)}-V_\lambda$ 、 $V_{H(P)}-V_K$ 、 $V_{H(P)}-V_\lambda$ の各サブライブラリーは、それぞれ 1.1×10^8 、 2.1×10^8 、 8.4×10^7 、 5.3×10^7 クローンの多様性を有すると評価された。

(1-2) パンニング

25 ヒト IL-18 を 0.1M NaHCO₃ 1 mL に溶解し、35mm のディッシュ（岩城）に 4℃で一晩反応させて固定化した。次いで、0.5%ゼラチン/PBS を用いて 20℃で 2 時間ブロッキングした後、0.1%Tween20-PBS で 6 回洗浄した。これに、健常人由来の抗体ファージライブラリー（1 本鎖可変領域断片 (scFv) 提示ファージ液）を 0.9mL (1×10^{12} tu/mL) 加え、反応させた。

次に、この反応液を、0.1%Tween20-PBS で 1.0 回洗浄した後、1.0mL のグリシ

ン緩衝液 (pH2.2) を加え、IL-18 と結合する s c F v 提示ファージを溶出した。溶出したファージに、1 M Tris (hydroxymethyl)aminomethane-HCl, (pH9.1) を加えて pH を調製した後、対数増殖期の大腸菌 T G 1 に感染させた。感染後の T G 1 を 3000×g, 10 分で遠心分離して、上清を除き、200μL の 2×Y T 培地で懸濁し、S O B A G プレート (2 % グルコース、100μg/ml のアンピシリン含有 S O B プレート) に播き、30℃ のふ卵器中で一晚培養した。生じたコロニーは適量の 2×Y T 培地を加えスクレイパー (Costar) を使って懸濁、回収した。

この T G 1 液 50 μL を、30 mL の 2×Y T A G 培地に植え、ヘルパーファージを用いてレスキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。健康人由来ファージライブラリー $V_{H(Y)}-V_K$ 、 $V_{H(Y)}-V_\Lambda$ 、 $V_{H(W)}-V_K$ 、 $V_{H(W)}-V_\Lambda$ 、それぞれについて、前述の IL-18 固定化プレートを用いてパンニングを計 2 回行った。2 回目のパンニング後に、S O B A G プレートから任意にクローンを抽出し、s c F v の発現の確認及び IL-18 E L I S A による特異性の確認 (スクリーニング) と塩基配列の解析とを行った。

(1-3) IL-18 E L I S A によるスクリーニング

分離したクローンをスクリーニングするための E L I S A は、ヒト IL-18 を E L I S A プレートに固定化して行った。具体的には、2 μg/mL のヒト IL-18、2.5 μg/mL のヒト血清アルブミン (H S A) を、40 μL/well の E L I S A プレート (Nunc) に入れ、4℃ で 16 時間静置し、固定化した。固定化プレートは、0.5 % B S A、0.5 % ゼラチン及び 5 % スキムミルクを含む P B S 溶液 400 μL/well を E L I S A プレートに入れ、4℃ で 2 時間静置し、ブロッキングを行った。

次に、この E L I S A プレートに、s c F v 提示ファージを含む試料液 40 μL/well を入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で 5 回洗った。続いて、この固定化された s c F v ファージに、ビオチン標識した抗 M13 モノクローナル抗体 (Pharmacia biotech) を加え、アルカリフォスファターゼ (A P) 標識した抗マウス IgG 抗体を二次抗体として反応させた。この反応液を洗浄液で 5 回洗った後、発色基質液 (1 g/mL p-nitrophenyl phosphate (Wako)、10% ジエタノールアミン (Wako) を含む P B S 溶液) を 50 μL/well 入れ、遮光し、室温 ~ 3

7℃で、5～10分発色させた。マルチプレートオートリーダーNJ-2001 (Inter Med) で 405nm の吸光度を測定した結果、評価したクローン全てが、IL-18 に特異的であることが確認できた。その結果を図1に示す。

(1-4) クローンの配列分析

- 5 次に、単離したクローンの s c F v 遺伝子の V_H鎖及び V_L鎖遺伝子の DNA 塩基配列を Dye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。E L I S A 及び配列分析の結果、単離したクローンは2種に分類された (h 18-40、h 18-108)。

- 10 なお、配列番号1および7にはクローン番号 h 18-108 の V_H鎖及び V_L鎖遺伝子の塩基配列がそれぞれ示される。また、配列番号3および8にはこの V_H鎖及び V_L鎖のアミノ酸配列が示される。

(1-5) ヒト抗 IL-18 s c F v の発現と精製

- 15 前記 (1-2、3) で単離したヒト IL-18 に反応する s c F v クローン (h 18-40・h 18-108) からプラスミド DNA を回収して、常法に従って大腸菌 HB1251 を形質転換した。2%グルコース及び 100µg/ml のアンピシリンを含む 2×Y T 培地でこれら的大腸菌を一夜前培養後、グルコースフリーの 2×Y T 培地に一部移植し、終濃度 1 mM IPTG、100µg/ml のアンピシリンを加えて更に一夜培養して s c F v の発現誘導を行った。培養終了後菌体を遠心回収し、1 mM E D T A を含む P B S に懸濁して氷中に 30 分菌体を放置した。次いで 8,900×g で
20 30 分間遠心し、上清を回収して 0.45µm フィルター濾過後、ペリプラズム画分から s c F v を精製するための出発材料とした。

- 25 このようにして調製した精製のための出発材料を、抗 E tag 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、常法に従って精製した。P B S で透析後、エンドトキシン除去カラム Detoxi-gel (PIERCE 社) で添付のプロトコルに従いエンドトキシンを除去した。分子量カット 10,000 の Centricon (Amicon 社) で濃縮後、0.45µm フィルター濾過して精製標品とした。

(1-6) 精製 s c F v の IL-18 に対する結合性

次に、精製 s c F v (h 18-40・h 18-108) の IL-18 に対する結合性を E L I S A 法で測定した。P B S で 0.5µg/mL に調製したヒト IL-18 を固相化した 96

穴プレート (NUNC. MAXISORP) に、精製 s c F v を 100 μ L 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。0.05% Tween-PBS (以下 PBST と省略することもある) で 5 回洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗 E tag 抗体と更に 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、発色基質液を加えて呈色させ、405nm の吸光度を測定して結合性を評価した。その結果を図 2 に示す。同図に示すように、2 種の抗体 (h18-40
5 \cdot h18-108) は全て IL-18 と特異的に結合した。

(1-7) IL-18 に刺激されたヒト骨髄単核球 KG-1 細胞からの IFN- γ 産生に対する作用

IL-18 (20ng/100 μ L) と scFv とを反応させた後に、KG-1 cell (3 \times 10⁵ cells/ 100 μ L) 培養液に加え、24 時間後の培養上清中における IFN- γ 量を ELISA (Biosource) により測定した。scFv (h18-40 \cdot h18-108) に関して IL-18 阻害活性を KG-1 cell の IFN- γ 産生で調べた結果、コントロールおよび scFv (h18-40) では阻害活性は見られなかったが、scFv (h18-108) は濃度依存的に KG-1 cell の IFN- γ 産生を抑制した。図 3 に、その結果を示す。

15 (1-8) IL-18 のヒト骨髄単核球 KG-1 細胞への結合阻害作用

ビオチン標識 IL-18 (400ng/ 50 μ L) と scFv (コントロールまたは h18-108) とを反応させた後に KG-1 cell (1 \times 10⁶ cells/ 50 μ L) 培養液に加え、phycoerythrin 標識ストレプトアビジン (Becton Dickinson) を反応させフローサイトメトリー解析 (Beckman Coulter) を行った。

20 図 4 および 5 に示すように、scFv (h18-108) が IL-18 の KG-1 cell への結合を阻害するかをフローサイトメトリー解析で調べた結果、コントロール scFv は IL-18 の結合に変化は見られなかったが (図 4)、h18-108 は IL-18 の KG-1 cell への結合を濃度依存的に阻害した (図 5)。

(1-9) scFv (h18-108) の特性

25 ヒト IL-18 に対する特異性を示した scFv h18-108 について、ウェスタンブロッティングを行った結果、図 6 に示すように、分子量は約 30 kDa であった。また、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、図 7 に示すように、分離パターンから、9 割がモノマーの s c F v を形成し、残りの 1 割がダイマーを形成していることが確認された。

〔実施例 2〕

実施例 2 では、IL-18 によって刺激した Th 1 細胞および Th 2 細胞から産生するサイトカインについて検討した。

(2-1) 試薬

5 組み換えヒト IL-2, IL-4, IL-12, および IFN- γ は、R&D (Minneapolis, MN) から入手した。組み換え IL-18 は、MBL 社 (名古屋日本) から入手した。FITC (フルオレセインイソチオシアネート) - 抗ヒト CD4 mAb (モノクローナル抗体) または CyChrome (シトクロム) - 抗ヒト CD4 mAb, FITC-抗ヒト CD45 RAmAb, FITC-抗ヒト IFN- γ mAb, 10 PE-抗ヒト IL-13 mAb, および抗ヒト IL-12 mAb は、Pharmingen (San Diego, CA) から入手した。PE-抗ヒト IL-18 R α mAb (クローン 70625), 抗ヒト CD3- ϵ mAb, および抗ヒト IL-4 mAb は、R & D から入手した。

(2-2) in vitro での Th 1 細胞または Th 2 細胞の作製

15 健康なドナー末梢血から、ナイーブ CD4⁺CD45 RA⁺T 細胞 (CD4 および CD45 陽性 T 細胞) を単離した (K. Nakanishi et. al., Int. Immunol. 12:151.). PHA (1 μ g/mL), IL-12 (50 μ g/mL), および中和抗 IL-4 mAb (500ng/mL)、または、PHA (1 μ g/mL), IL-4 (200 μ g/mL), および中和抗 IL-12 mAb (10 μ g/mL) とともに、24 ウェルプレートで、CD4⁺CD45 RA⁺T 細胞 (1 \times 10⁶/mL) を培養することにより、Th 1 細胞および Th 2 細胞を作製した。このようにして刺激した T 細胞を、3 日目に洗浄し、培地に IL-2 を 100 U/mL を加え、さらに 4 日間培養した。

(2-3) IFN- γ ⁺ Th 1 細胞の単離

25 IFN- γ ⁺ Th 1 細胞を単離するため、分極化した Th 1 細胞を、固定化抗 CD3 (5 μ g/mL) および IL-2 (100 U/mL) とともに、24 ウェルプレート中で培養した。次に、その培養物に、生存する Th 1 細胞が IFN- γ の発現を豊富にする処理を行った。3 時間後、付着細胞のみを、回収し、抗 CD45 / 抗 IFN- γ 二重特異性抗体 (Miltenyi Biotec) と共に、5 分間氷上でインキュベートした。処理した細胞を 50 mL の底部が円錐状の試験管に移し

、その試験管を 37℃ の水浴に配し、20 ml の温めた培養液中で 5×10^4 細胞/ml の濃度で細胞を培養した。30 分後、冷却した 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝液溶液 (PBS) で、細胞を洗浄した。細胞表面で捕捉された IFN- γ を、PE-抗ヒト IFN- γ を用いて検出した。また、自動 MACS を用いる抗 PE マイクロビーズにより、表面に IFN- γ を発現した Th1 細胞を、確実に単離した。

(2-4) in vitro 培養

新たに分極化した Th1 細胞および Th2 細胞、および、新たに分極化した Th1 細胞から選別した IFN- γ^+ 細胞を、種々の濃度の IL-18 存在下、固定化抗 CD3 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) を含んだ $1 \times 10^5/0.2\text{mL}$ /ウェルで再培養した。培養開始から 6 時間から 72 時間経過後、上澄を回収し、IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IFN- γ , および GM-CSF の含有量を、ELISA (R&G) により測定した。

(2-5) フローサイトメトリー

分極化した Th1 細胞 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) を、24 ウェルプレートで、固定化 CD3 のみ、および、固定化 CD3 と IL-18 ($100\text{ng}/\text{mL}$) とにより、72 時間再刺激した。最後の 3 時間は、サイトカインの分泌を阻害するため、 $2 \mu\text{M}$ のモノニンシンを添加した。細胞質内の IFN- γ^+ 、および/または IL-13 $^+$ 細胞の染色による分析は、文献 (K. Nakanishi et.al., J. EXP. Med., 2004, 199, 535-545.) に従って行った。Th1 細胞および Th2 細胞上の IL-18R α の発現量を測定するため、ヒト IgG による FcR のブロッキング後、各細胞を、FITC 抗ヒト CD4、および PE 抗ヒト IL-18R α 鎖 mAb またはコントロール PE-マウス IgG1 mAb により、30 分間、4℃ で、1% FCS を含む PBS 中でインキュベーションした。このようにして得られたサンプルを、FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, CA) によって分析した。

(2-6) 実験結果

(2-2) ~ (2-5) に従い、健常なドナー末梢血から単離したナイーブ CD4 $^+$ CD45RA $^+$ T 細胞を、in vitro で、Th1 細胞および Th2 細胞を誘導する条件下、連続して 7 日間刺激した。

その結果を、図8に示す。なお、図8では、固定化抗CD3のみにより刺激した結果 (α -CD3) と、固定化抗CD3とIL-18とにより刺激した結果 (α -CD3+IL-18) を示している。

図8に示すように、固定化抗CD3を用いた試験では、Th2細胞は、かなりの量のIL-4, IL-5, およびIL-13を産生したが、IFN- γ を産生しなかった。また、Th1細胞は、主に、IFN- γ , IL-8, GM-CSFを産生した。

また、図8に示すように、固定化抗CD3に加えてIL-18により刺激しても、Th2細胞からのTh2サイトカインの産生は、増加しなかった。これに対し、その処理によって、Th1細胞からのIFN- γ , IL-8, IL-13, およびGM-CSFの産生は、著しく増加した。

Th1細胞とTh2細胞とのIL-18に対する応答の違いの根本となるメカニズムは、主に、Th1細胞上へのIL-18R α 鎖の発現の選択性によって説明できる。図9は、上記の刺激による、各細胞の表面のIL-18R α 鎖の発現レベルを示す図である。図9に示すように、ヒトTh1細胞は、高レベルのIL-18R α 鎖を発現するのに対し、Th2細胞は、IL-18R α 鎖の発現量は、わずかである。したがって、IL-18Rを発現するTh1細胞は、抗CD3とIL-18とに応答して、Th1サイトカイン, Th2サイトカイン, およびGM-CSFを産生する性質を示す。

同時に、固定化抗CD3により刺激を受けたTh1細胞の、IL-18投与量による応答性 (IFN- γ , IL-8, IL-13の産生) について検討した。そこで、Th1細胞を、種々の濃度のIL-18 (~ 500 ng/mL) により、固定化抗CD3存在下、3日間、刺激した。図10は、IL-18の用量と、Th1細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。図10に示すように、Th1細胞は、IL-18存在下、用量依存的に、IFN- γ , IL-8, IL-13の産生が増加した。なお、抗CD3刺激を受けたTh2細胞を、IL-18によりさらに刺激しても、サイトカイン産生の応答は、増加しなかった。したがって、図10に示すように、ヒトTh1細胞のみが、抗原とIL-18との刺激に応答し、Th1サイトカイン、Th2サイトカインばかりでなく、GM

ーCSF, IL-8を産生するという、特有の作用を示した。

このように、IL-18は、分極化したヒトTh1細胞からのIFN- γ , IL-8, IL-13およびGM-CSF産生を誘導した。

次に、抗CD3とIL-18による刺激後のサイトカインの産生の速度論を検討した。図11は、Th1細胞の刺激後の培養時間と、Th1細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。図11に示すように、Th1細胞は、刺激後、比較的早期に、IFN- γ を産生し始めた。抗CD3による刺激の24時間後でさえ、大量のIFN- γ が検出された。これに対し、その時点では、IL-8もIL-13も検出されなかったが、刺激から72時間後、IL-8およびIL-13が検出された。通常は48時間の測定を行うため、当初、Th1細胞は、IFN- γ のみを産生するとみなしていた。しかし、図11に示すように、72時間後に、IL-8およびIL-13を検出することができた。抗CD3に刺激されたTh1細胞を、さらにIL-18によって刺激することにより、上記のサイトカインを、より早く、より多く産生することが、最も重要である。このように、IL-18刺激は、Th1細胞からのIFN- γ , IL-8, IL-13の産生を促進し、増加させた。

前述のように、IL-18刺激は、用量依存的に、抗CD3の刺激を受けたTh1細胞からのIFN- γ , IL-13の産生を誘導する(図10)。しかし、Th0細胞が、抗原とIL-18とに対する応答に、IFN- γ およびIL-13を産生する可能性を排除する必要がある。そこで、この可能性を排除するために、IL-18刺激を受けたTh1細胞における、細胞質IFN- γ および/またはIL-13に陽性のCD4⁺T細胞の割合を、FACS分析によって検討した。その結果を、図12に示す。

図12に示すように、固定化抗CD3とIL-18とにより刺激されたヒトTh1細胞の5.65%が、細胞質INF- γ およびIL-13に陽性であった。ところが、抗CD3のみによって処理したTh1細胞のわずか1.21%が、細胞質INF- γ およびIL-13に陽性であった。細胞内IFN- γ またはIL-13染色の特異性は、アイソタイプが適合するコントロール抗体では染色されないことから示されている。さらに、このような染色は、過剰の組み換えヒトI

IFN- γ 、または、IL-13による前処理によって完全に阻害される（データは示さず）。このように、Th1細胞が、抗CD3とIL-18とにより刺激された時に、IFN- γ およびIL-13を産生した。

次に、IL-18によるIFN- γ ⁺Th1細胞からのIL-13産生の誘導について検討した。IFN- γ を産生するTh1細胞も、抗CD3とIL-18とによる刺激を受けると、IL-13を産生する可能性を検討することは重要である。そこで、IFN- γ を発現するヒトTh1細胞から分泌されたIFN- γ を、そのTh1細胞の表面に固定化した抗IFN- γ 抗体によって得ることにより精製した。

図13は、抗CD3抗体刺激を受けたTh1細胞中の、IFN- γ ⁺Th1細胞の割合と、IFN- γ ⁺Th1細胞の陽性選別例とを示す図である。図13に示すように、抗CD3抗体で刺激を受けたTh1細胞の23.1%が、細胞表面でIFN- γ を発現した。次に、IFN- γ を細胞表面に発現するTh1細胞（IFN- γ ⁺Th1細胞）を、自動MACSを用いて、陽性選別した。99%の純度でIFN- γ ⁺CD4⁺Th1細胞を、精製できた。得られたIFN- γ ⁺Th1細胞を、抗CD3とIL-18と共に培養し、刺激した。図14は、この刺激による、IFN- γ ⁺Th1細胞からのサイトカインの産生量を示すグラフである。図14に示すように、その刺激によって、IFN- γ 、IL-8、およびIL-13の産生は、かなり増加するが、IL-4の産生は増加しなかった。従って、高度に精製されたIFN- γ を発現する生きたヒトTh1細胞は、その細胞表面にIL-18R α 鎖を強く発現しており、抗CD3とIL-18とによる刺激を受けると、IFN- γ 、IL-8、およびIL-13を産生すると結論づけることができる。この結果は、ヒトTh1細胞が、そのTCR（T細胞抗原レセプター）に抗原が結合し、さらに、IL-18が作用すると、刺激を受けたTh1細胞が、IFN- γ 、IL-8、およびIL-13の産生を増強することを示している。なお、図8、10、11、13および14では、独立した4回の実験の代表値であり、各実験では、同様の結果が得られた。

以上のように、Th1細胞が、抗原とIL-18とによって刺激されると、Th1サイトカイン（IFN- γ など）、Th2サイトカイン（IL-9、IL-

13), ケモカイン (RANTES, MIP-1 α , およびGM-CSFを産生する。気管支上皮に対するIFN- γ とIL-13との刺激が、最も重篤な気管支喘息を誘導する。従って、実施例1のscFvを投与して、IL-18の活性を阻害することにより、重篤な気管支喘息の治療が可能となる。

- 5 尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

10

産業上の利用の可能性

以上のように、本発明のヒトIL-18に対する抗体およびその断片は、ヒト由来のものである。それゆえ、ヒトIL-18が直接または間接的に関与する疾病の治療において、反復投与や長期投与を行っても、顕著な治療効果と高い安全性とを維持した治療薬を提供できるという効果を奏する。

15

請求の範囲

1. ヒトインターロイキン-18に対する、ヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

- 5 2. 以下の(a)または(b)のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域と、(c)または(d)のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域とを含む請求の範囲1に記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

(a) 配列番号4～6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

- 10 (b) 配列番号4～6に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

(c) 配列番号10～12に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

- 15 (d) 配列番号10～12に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

- 20 3. 以下(e)または(f)のポリペプチドからなるH鎖可変領域と、(g)または(h)のポリペプチドからなるL鎖可変領域とを含む請求の範囲1または2に記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

- 25 (g) 配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

4. 以下(e)または(f)のポリペプチドからなる、ヒトインターロイキン-

1 8に対するヒト由来の抗体のH鎖可変領域断片。

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

5 5. 以下(g)または(h)のポリペプチドからなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体のL鎖可変領域断片。

(g) 配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

10 6. 請求の範囲2に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または請求の範囲4に記載のH鎖可変領域断片と、請求の範囲2に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または請求の範囲5に記載のL鎖可変領域断片とを連結してなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体の1本鎖可変領域断片。

7. 請求の範囲2に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または請求の範囲4に記載のH鎖可変領域断片、および/または、請求の範囲2に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または請求の範囲5に記載のL鎖可変領域断片に、ヒト由来の定常領域を連結してなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体またはその断片。

8. 上記抗体の断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scAb、またはscFvFcである請求の範囲7に記載の抗体の断片。

9. 請求の範囲1~8のいずれか1項に記載の抗体またはその断片に、修飾剤が結合されてなる修飾抗体。

10. 請求の範囲1~8のいずれか1項に記載の抗体またはその断片をコードする遺伝子。

11. 配列番号1または7に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する請求の範囲10に記載の遺伝子。

1 2. 請求の範囲 10 または 11 に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

1 3. 請求の範囲 10 または 11 に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

1 4. 請求の範囲 10 または 11 に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト由来のヒト抗ヒトインターロイキン-18 抗体またはその断片を生産する方法。

1 5. 請求の範囲 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片、または請求の範囲 9 に記載の修飾抗体を用いたヒトインターロイキン-18 の検出器具。

1 6. 請求の範囲 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片、または請求の範囲 9 に記載の修飾抗体を含むヒトインターロイキン-18 検出試薬を用いて、被検試料中のヒトインターロイキン-18 量を測定する免疫疾患の診断キット。

1 7. 請求の範囲 16 に記載の検出試薬を用いて測定した被検試料中のヒトインターロイキン-18 量に基づいて免疫疾患を診断する方法。

1 8. ヒトインターロイキン-18 アンタゴニストを有効成分とするヒトインターロイキン 18 活性阻害剤。

1 9. 上記ヒトインターロイキン-18 アンタゴニストが、以下のいずれかの物質である請求の範囲 18 に記載のヒトインターロイキン 18 活性阻害剤。

i) 請求の範囲 1～3 のいずれか 1 項に記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18 抗体

ii) 請求の範囲 4～8 のいずれか 1 項に記載の抗体の断片

iii) 請求の範囲 9 に記載の修飾抗体

iv) 上記 i)～iii) のいずれかに記載の抗体、抗体の断片、または修飾抗体が認識するヒトインターロイキン-18 上の抗原決定領域に基づいて分子設計された低分子化合物。

2 0. 請求の範囲 10 または 11 に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

2 1. 請求の範囲 18 または 19 に記載のヒトインターロイキン-18 活性阻害剤、または請求の範囲 20 に記載の遺伝子治療剤を含む免疫疾患治療剤。

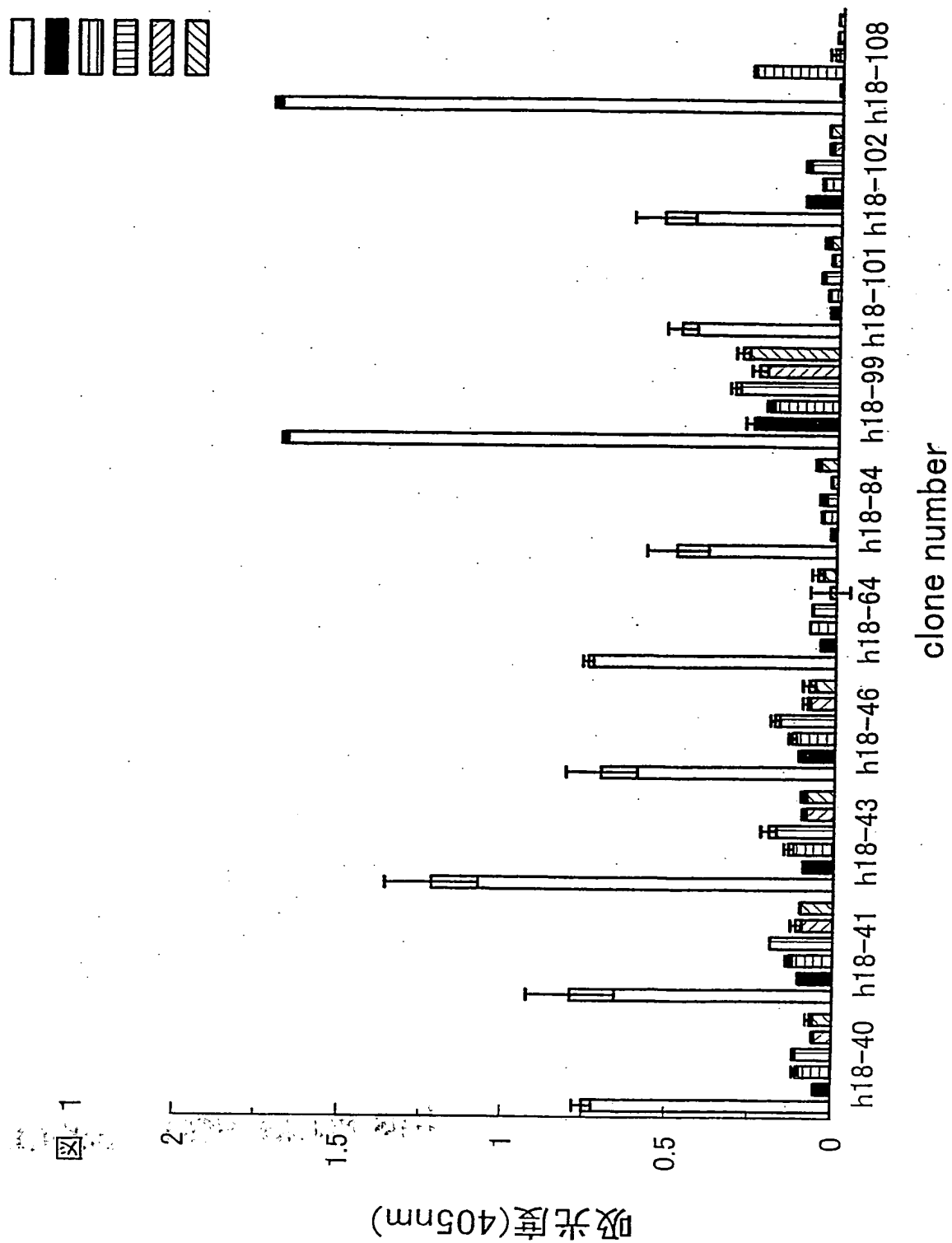
2 2. 請求の範囲 21 に記載の免疫疾患治療薬を投与することによる免疫疾患の治療方法。

23. 抗原とヒトインターロイキン-18とによる刺激によってヘルパーT1細胞から産生するサイトカインを阻害することを特徴とする請求の範囲21に記載の免疫疾患治療剤。

5 24. ヒトIL-18が関与するアレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患に適用するものであることを特徴とする請求の範囲21または23に記載の免疫疾患治療剤。

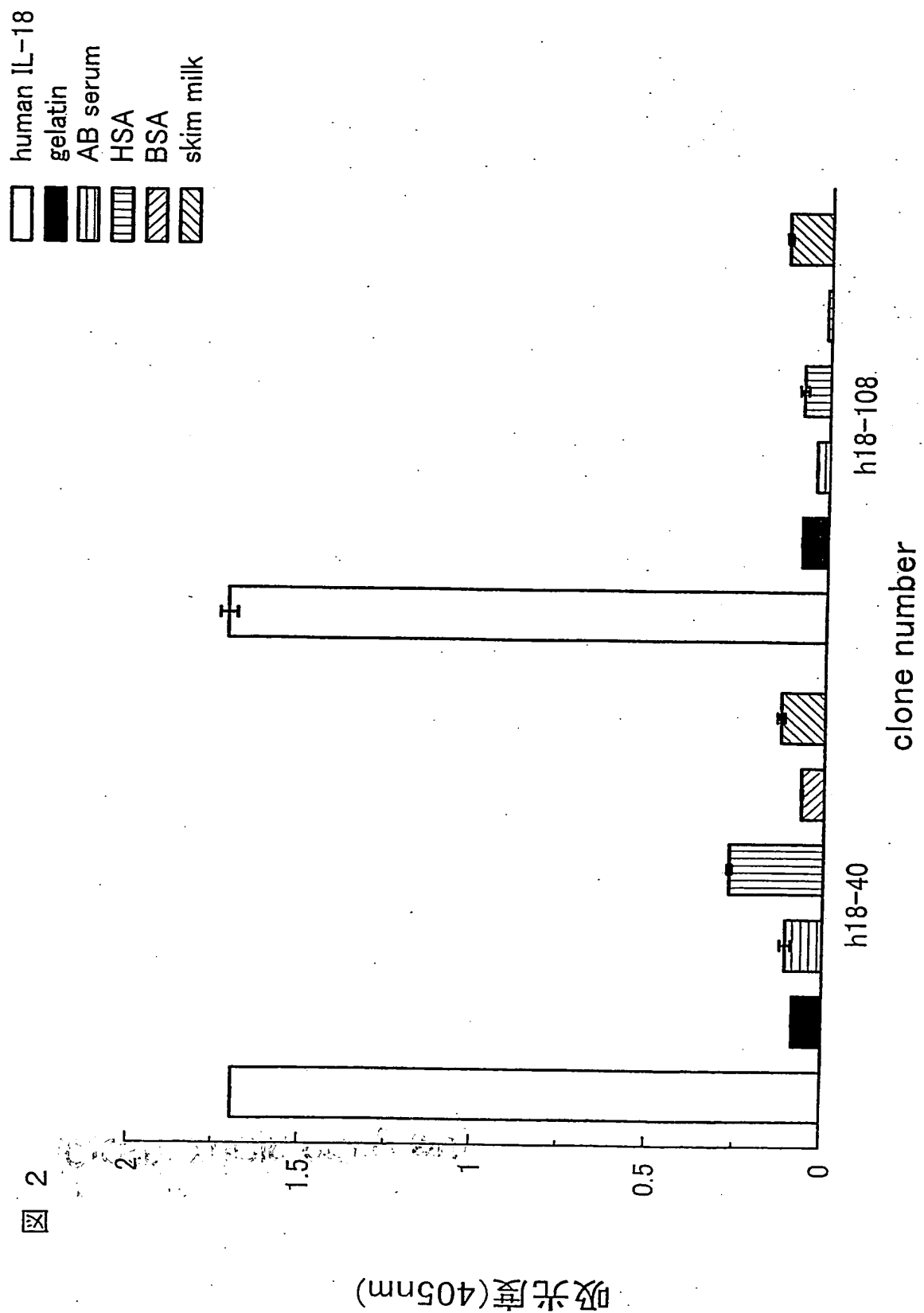
1/13

human IL-18
gelatin
AB serum
HSA
BSA
skim milk



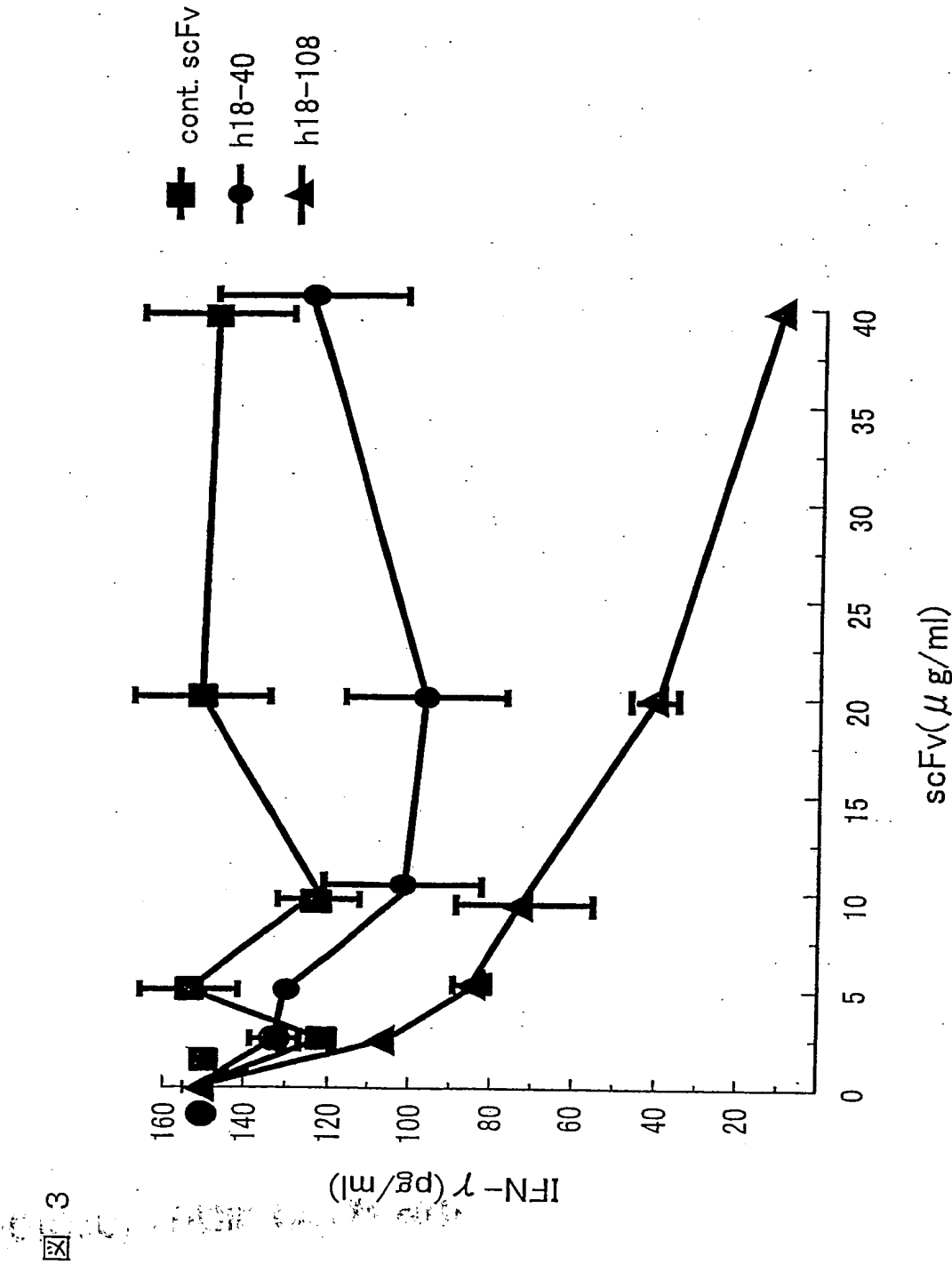
This Page Blank (uspto)

2/13



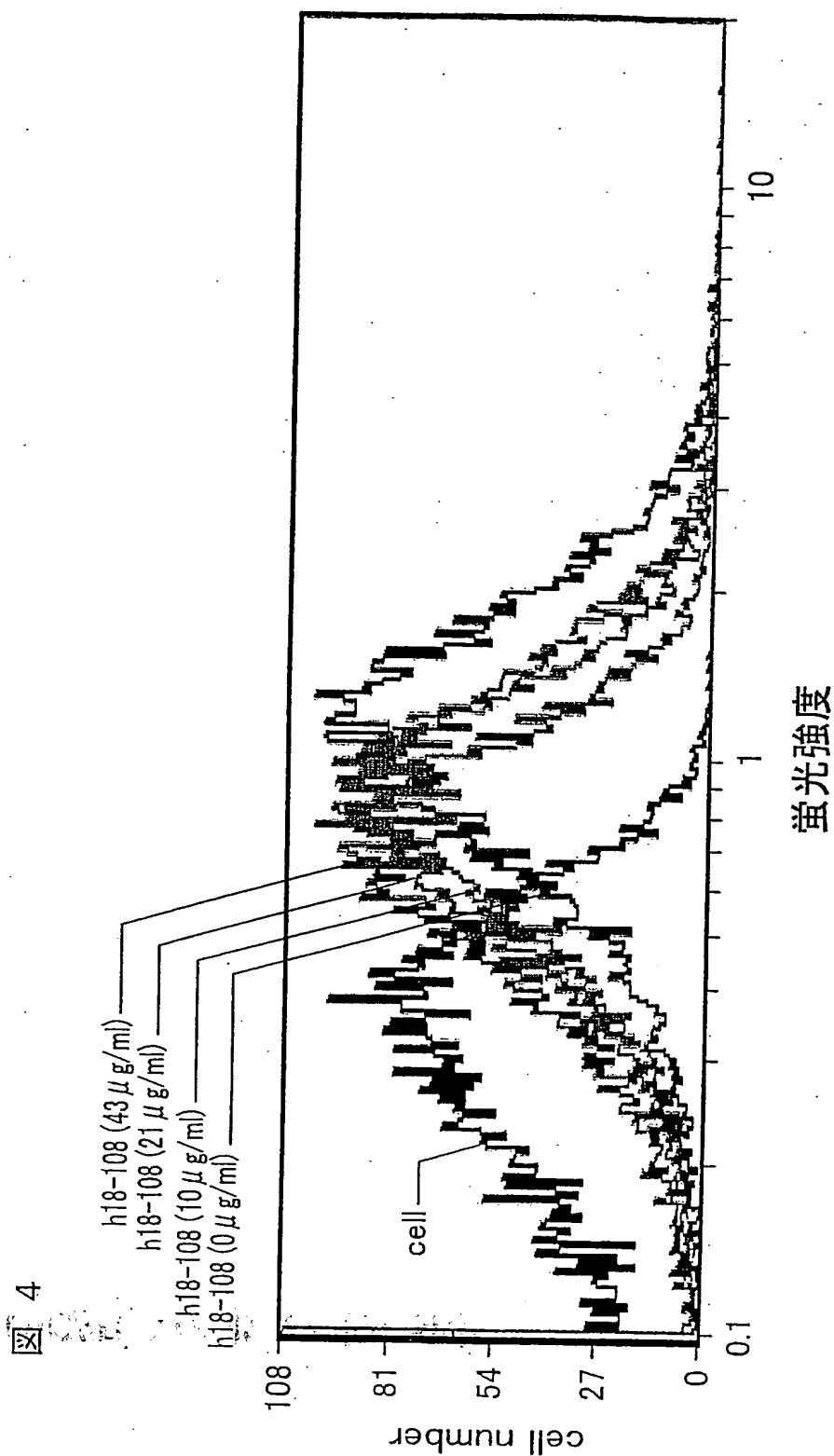
This Page Blank (uspto)

3 / 1 3



This Page Blank (uspto)

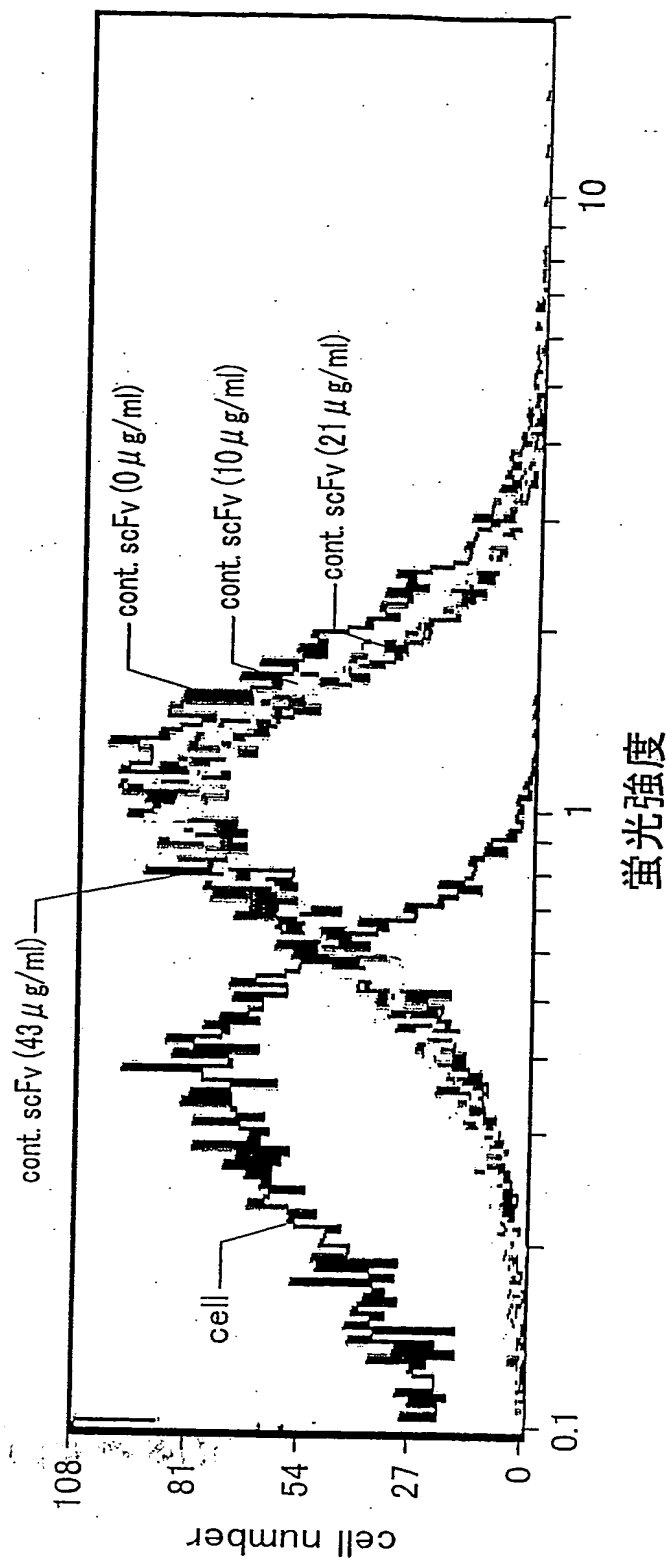
4/13



This Page Blank (uspto)

5/13

5



This Page Blank (uspto)

6/13

図 6

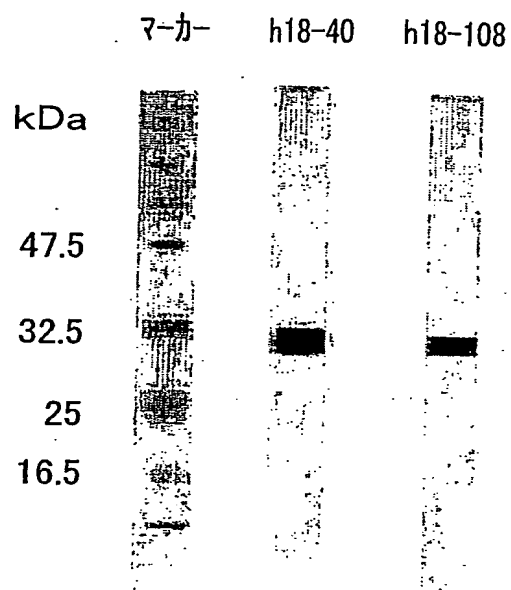
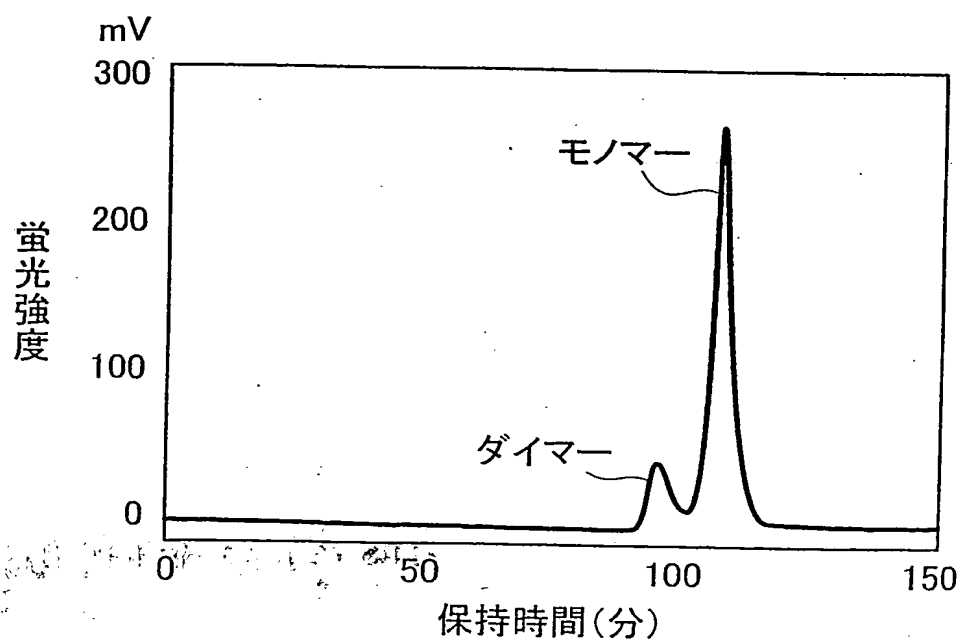
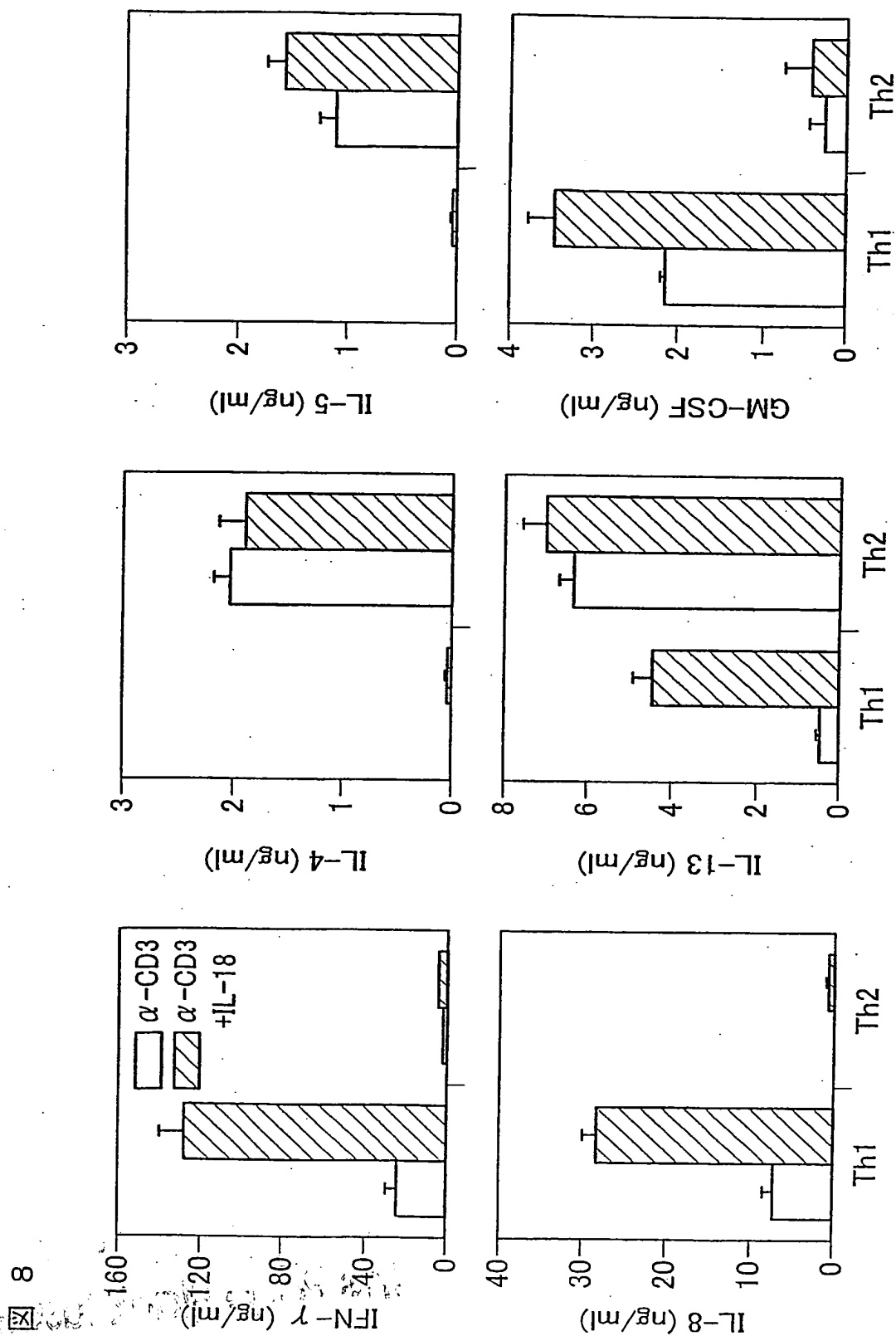


図 7



This Page Blank (uspto)

7/13

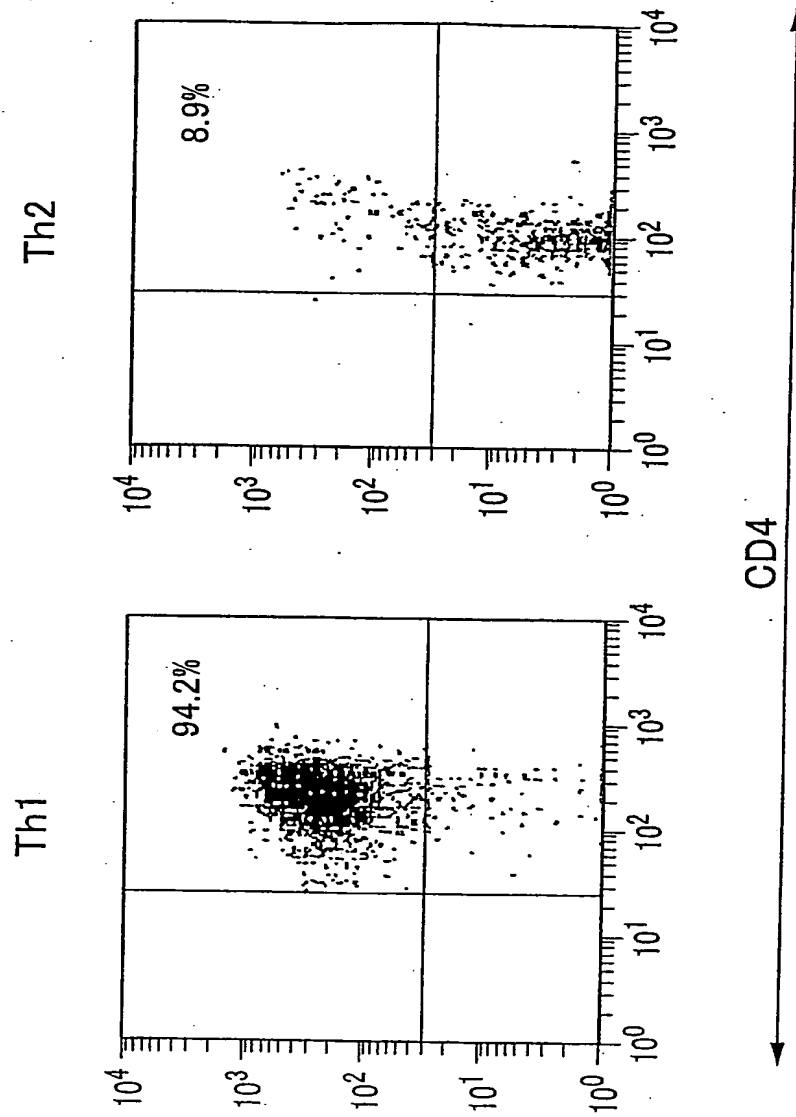


This Page Blank (uspto)

8/13

9

IL-18R α



This Page Blank (uspto)

9/13

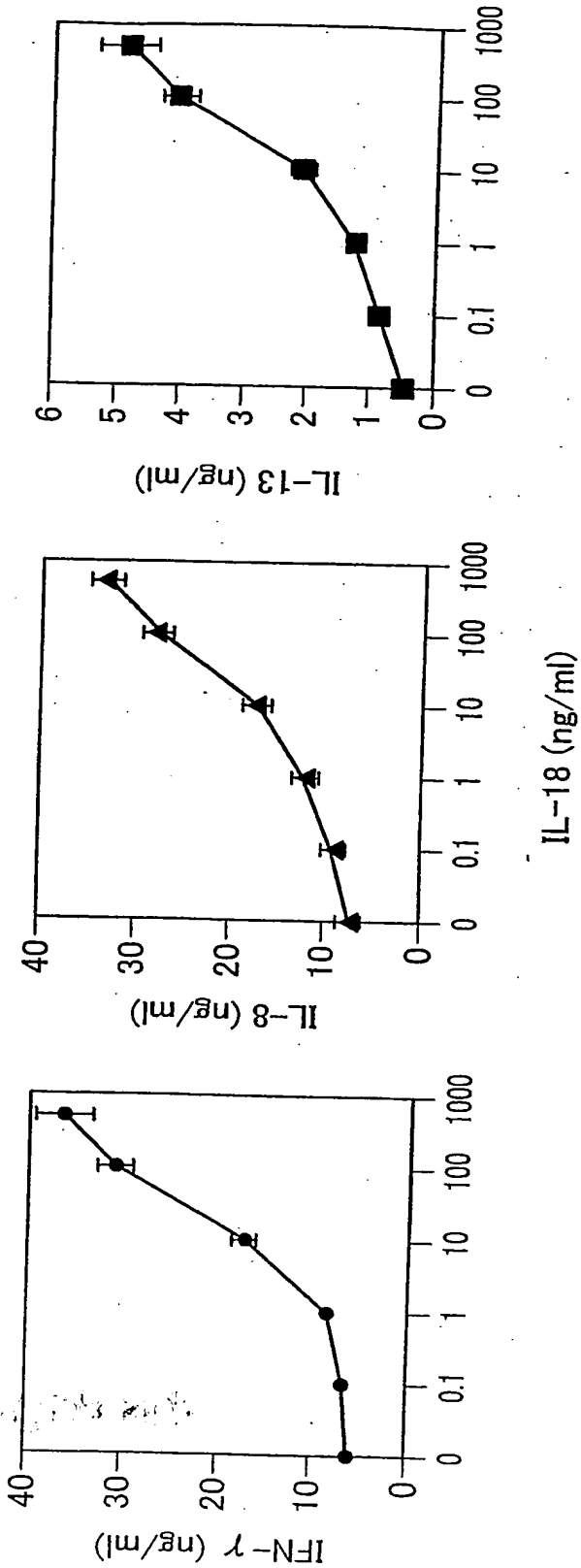
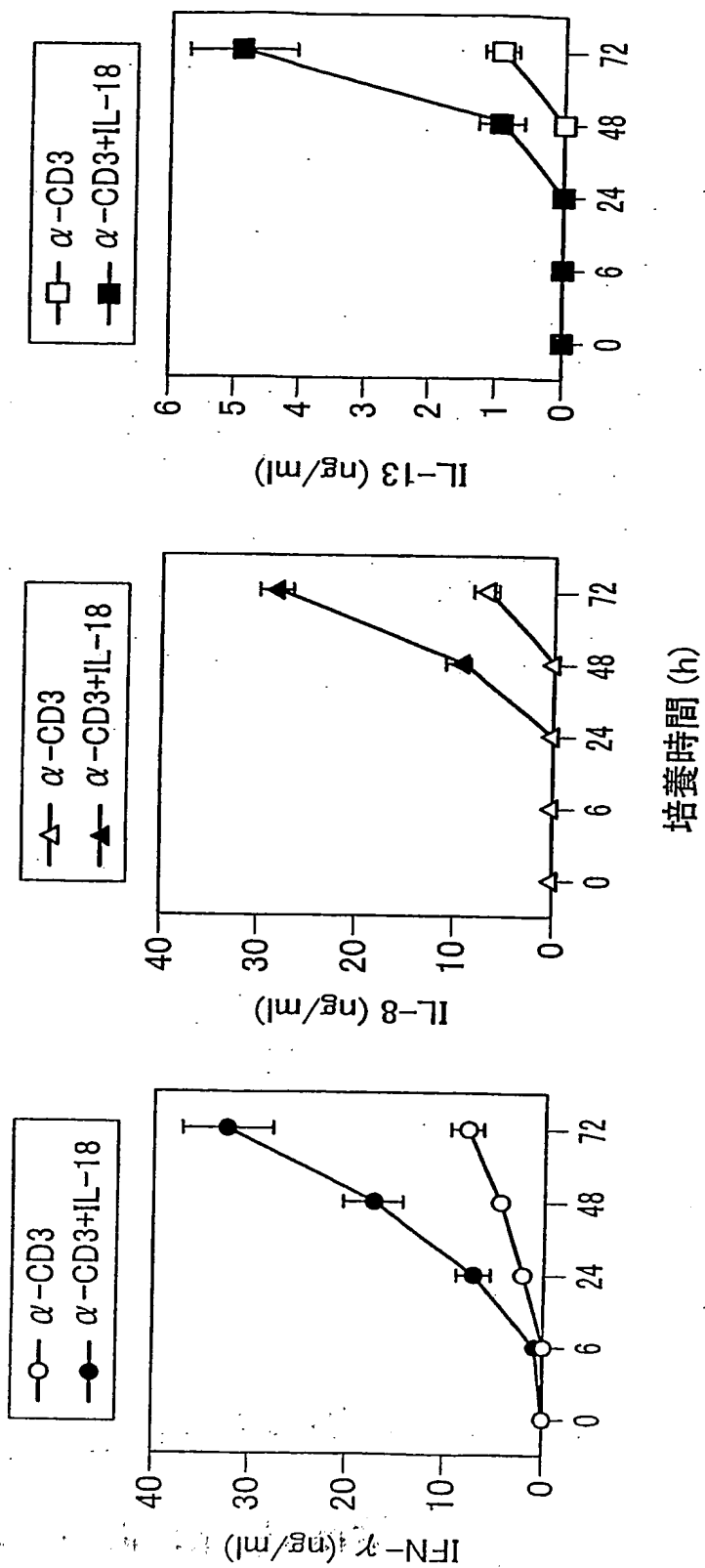


図 10

This Page Blank (uspto)

10/13

図 11



This Page Blank (uspto)

11/13

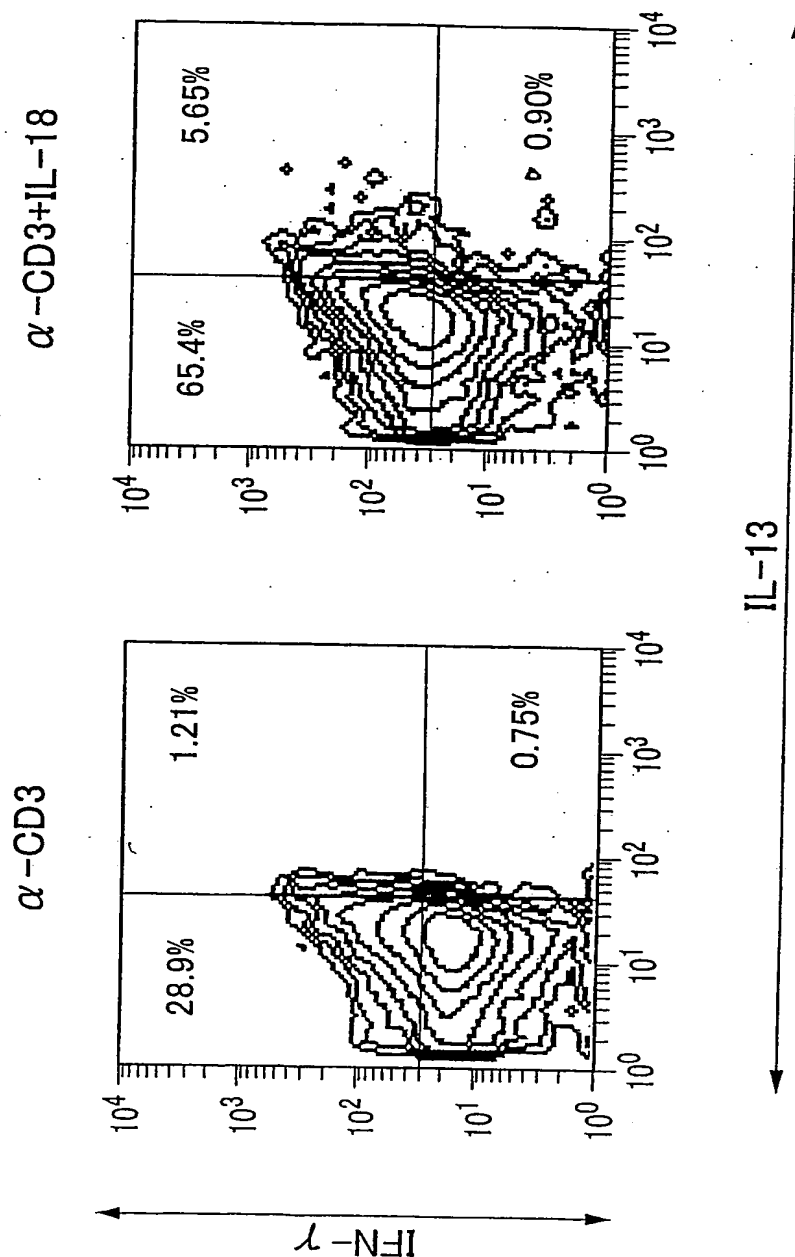
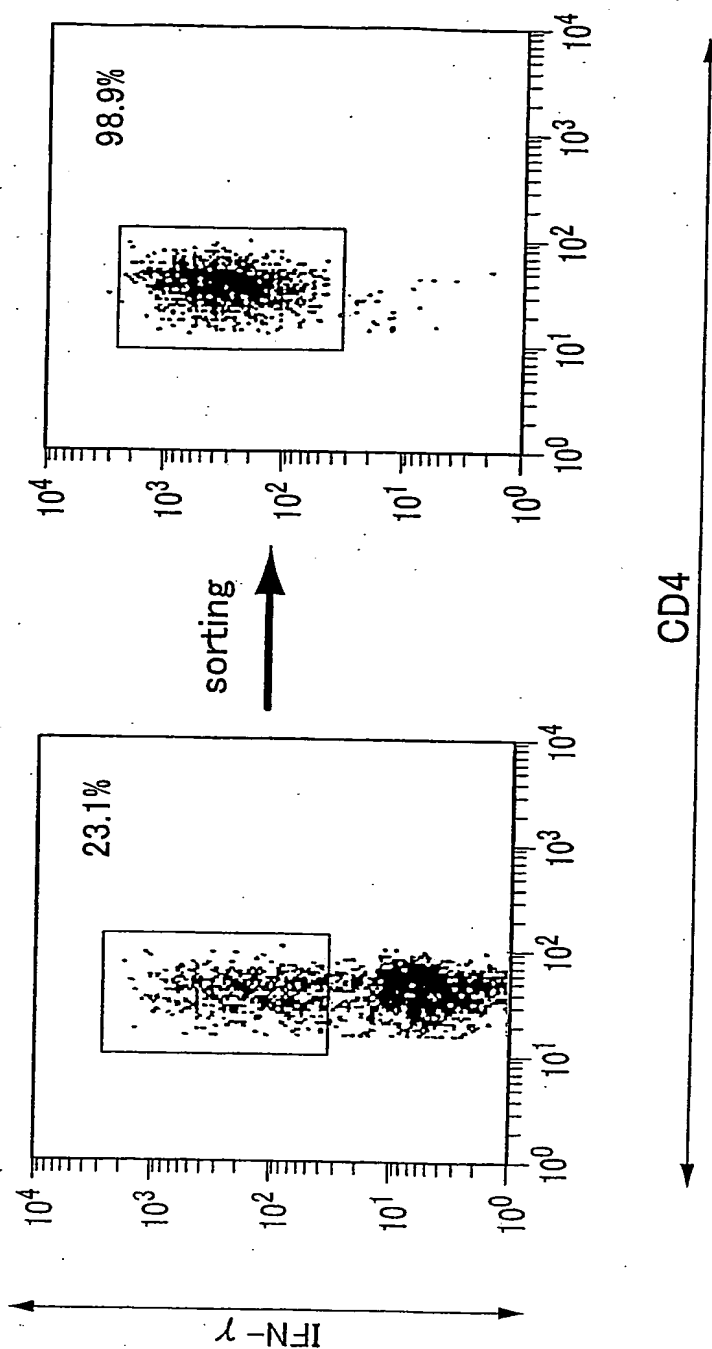


図 12



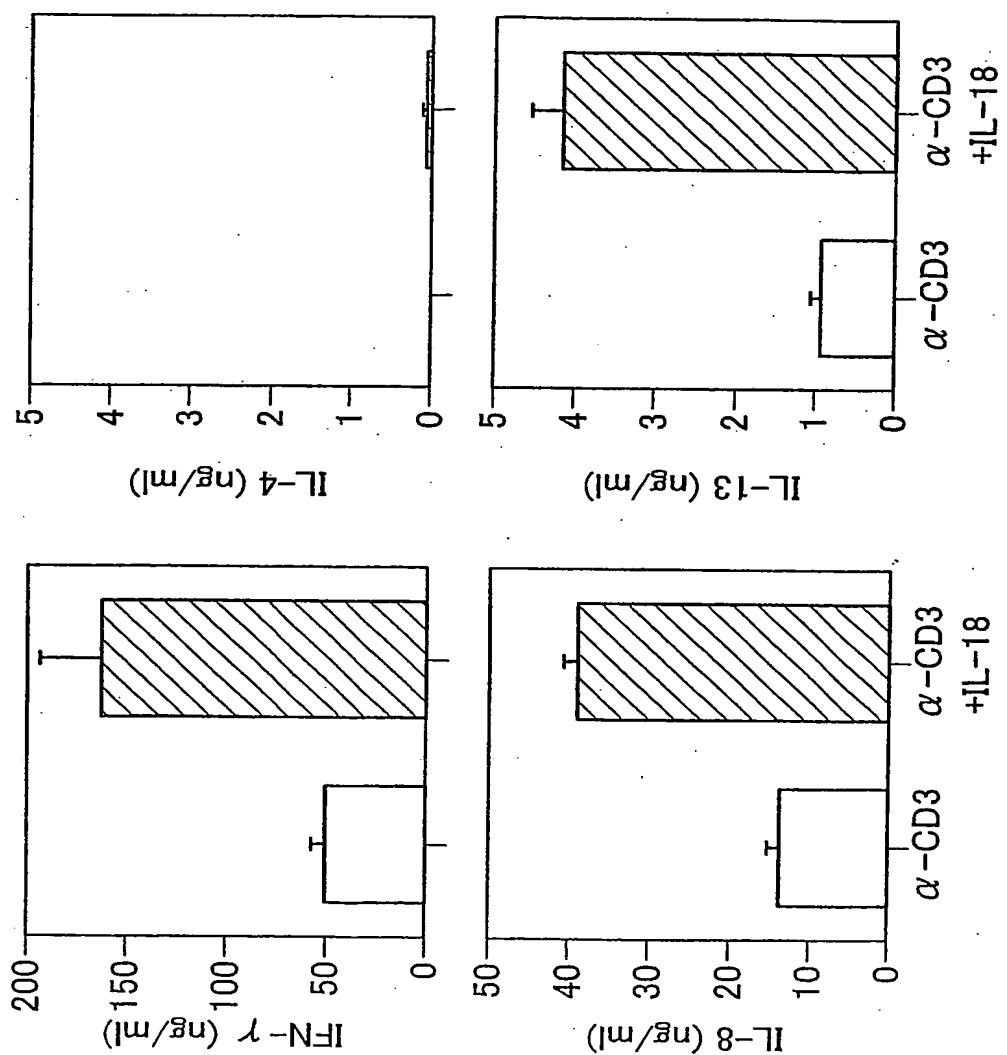
This Page Blank (uspto)

12/13



This Page Blank (uspto)

13/13



This Page Blank (uspto)

1/10

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY

<120> Human antibody against human interleukin-18, the
antibody fragment, and the use thereof

<130> A211-04PCT

<150> JP 2003-125948

<151> 2003-04-30

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaggaggc ctggggcctc agtgagggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcaact agtcactata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg ggtggcaata atcaacccta gtgatggcag aacagactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccgtg accagggaca cgtccgcgag cagtgtctac 240

2/10

tcctgcaagg catctggata caccttcaact agtcactata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg ggtggcaata atcaacccta gtgatggcag aacagactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccgtg accagggaca cgtccgcgag cagtgtctac 240
atgggaataa gcagcctgag atctgaggac acggccatgt attactgtgc gagaacagcg 300
cgtggattca gttatgcgac agactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 2

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 2

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg agg cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg agg gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc act agt cac 96
Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

20

25

30

3/10

tat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg gtg 144

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

gca ata atc aac cct agt gat ggc aga aca gac tac gca cag aag ttc 192

Ala Ile Ile Asn Pro Ser Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

cag ggc aga gtc acc gtg acc agg gac acg tcc gcg agc agt gtc tac 240

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Ser Val Tyr

65

70

75

80

atg gga ata agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288

Met Gly Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

gcg aga aca gcg cgt gga ttc agt tat gcg aca gac tgg ggc cag gga 336

Ala Arg Thr Ala Arg Gly Phe Ser Tyr Ala Thr Asp Trp Gly Gln Gly

100

105

110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca

357

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

4/10

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Arg Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

20

25

30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Ile Ile Asn Pro Ser Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Ser Val Tyr

65

70

75

80

Met Gly Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Thr Ala Arg Gly Phe Ser Tyr Ala Thr Asp Trp Gly Gln Gly

5/10

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser His Tyr Ile His

1

5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Ile Asn Pro Ser Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

6/10

Gly

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Ala Arg Gly Phe Ser Tyr Ala Thr Asp

1

5

10

<210> 7

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

tcctatgagc tgactcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60

acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagccaggc 120

caggcccctg tgctgggtgat atataaagac agtgagaggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240

7/10

gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcagtg gtacttatgt ggtattcggc 300
ggaggggaccc agctcaccgt tttaggt 327

<210> 8

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 8

tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga caa 48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aaa aaa tat gct 96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

tat tgg tac cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg ctg gtg ata tat 144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

8/10

aaa gac agt gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc 192

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

agc tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa 240

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu

65

70

75

80

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt act tat 288

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr

85

90

95

gtg gta ttc ggc gga ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt 327

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

100

105

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

9/10

1

5

10

15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala

20

25

30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35

40

45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu

65

70

75

80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr

85

90

95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

100

105

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

10/10

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala Tyr

1

5

10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1

5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Val Val

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/08, C12Q1/68, A61K39/395, A61K48/00,
A61P43/00, A61P37/02, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/08, C12Q1/68, A61K39/395, A61K48/00,
G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/BIOTECHABS (STN),
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|------------------------|
| X | WO 01/62285 A ✓ (Applied Research Systems ARS Holding N.V.), 30 August, 2001 (30.08.01), Claims; pages 31, 52 & JP 2003-523403 A | 1-16, 18-21, 23, 24 |
| X | JP 5-304987 A ✓ (Mitsubishi Kasei Corp.), 19 November, 1993 (19.11.93), Seq. Nos. [0010], [0011] & EP 520499 A | 5, 7-13 |
| X | WO 01/62932 A ✓ (AMGEN INC.), 30 August, 2001 (30.08.01), Fig. 22 & JP 2003-523772 A | 5, 7-9 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 June, 2004 (03.06.04)

Date of mailing of the international search report
22 June, 2004 (22.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006403

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | Ignatovich, O. Tomlinson, I.M., Popov, A.V., Bruggemann, M. and Winter, G., Dominance of intrinsic genetic factors in shaping the human immunoglobulin Vlambda repertoire, J.Med.Biol., 294(2), 457 to 465(1999), Genbank accession numbers AF194805, 194806, 194807, 194809 | 10-13 |
| P,X | WO 03/76472 A (ONCOMAB GMBH.), 18 September, 2003 (18.09.03), Fig. 2 & DE 10210427 A | 5,7-13 |
| P,X | Soos J.M.; Polsky R.M.; Keegan S.P.; Bugelski P.; Herzyk D.J.; Identification of natural antibodies to interleukin-18 in the sera of normal humans and three nonhuman primate species., Clinical Immunology 109(2), 188-196, (2003) | 1-16,18-21, 23,24 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006403

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing ✓



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form ✓

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form ✓



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006403

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17, 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention according to claim 17 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body.
The invention according to claim 22 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006403

<Subject of search>

Concerning "a human interleukin-18 antagonist" and "a human interleukin-18 activity inhibitor" as described in claims 18 and 21, only small parts of the claimed substances, i.e., antibodies are supported by the description in the meaning within Article 6 of Patent Cooperation Treaty and disclosed in the description in the meaning within Article 5 of Patent Cooperation Treaty.

Thus, claims 18 and 21 and the description do not comply with the prescribed requirement to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

In this international search report, therefore, prior art documents were searched for based on the substances, i.e., antibodies, specifically presented in the description with respect to the inventions according to claims 18 and 21.

Concerning the low-molecular weight compound iv) of claimed 19, nothing is supported by the description in the meaning within Article 6 of Patent Cooperation Treaty and disclosed in the description in the meaning within Article 5 of Patent Cooperation Treaty.

Thus, claim 19 and the description do not comply with the prescribed requirement to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

In this international search report, therefore, prior art documents were searched for based on antibodies i) to iii) with respect to the invention according to claim 19.

10/20/04 11:28 AM 006403

This Page Blank (uspto)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁷ C12N15/09, C12P21/08, C12Q1/68, A61K39/395, A61K48/00, A61P43/00, A61P37/02, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁷ C12N15/09, C12P21/08, C12Q1/68, A61K39/395, A61K48/00, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/BIOTECHABS (STN)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq,

SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|---------------------|
| X | WO 01/62285 A (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) 2001. 08. 30, クレーム, p 31, 52 & JP 2003-523403 A | 1-16, 18-21, 23, 24 |
| X | JP 5-304987 A (三菱化成株式会社) 1993. 1. 19, 配列番号 10, 11 & EP 520499 A | 5, 7-13 |
| X | WO 01/62932 A (AMGEN INC.) 2001. 08. 30, Figure 22 & JP 2003-523772 A | 5, 7-9 |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 06. 2004

国際調査報告の発送日

22. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4 B

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|---------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | Ignatovich, O., Tomlinson, I. M., Popov, A. V., Bruggemann, M. and Winter, G., Dominance of intrinsic genetic factors in shaping the human immunoglobulin Vlambda repertoire, J. Mol. Biol. 294 (2), 457-465 (1999), Genbank accession numbers AF194805, 194806, 194807, 194809 | 10-13 |
| P X | WO 03/76472 A (ONCOMAB GMBH) 2003. 09. 18, FIG.2 & DE 10210427 A | 5, 7-13 |
| P X | Soos J.M.; Polsky R.M.; Keegan S.P.; Bugelski P.; Herzyk D. J., Identification of natural antibodies to interleukin-18 in the sera of normal humans and three nonhuman primate species, Clinical Immunology 109(2), 188-196 (2003) | 1-16, 18-21, 23, 24 |

第I欄 ニクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面
☒ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる
☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された
2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17, 22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲17の発明は、人体の診断方法に関するものである。
請求の範囲22の発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲18、21の「ヒトインターロイキン-18アンタゴニスト」や「ヒトインターロイキン-18活性阻害剤」について、特許協力条約第6条の意味において明細書に裏付けられ、また、特許協力条約第5条の意味において明細書に開示されているものは、抗体のみであり、クレームされたもののごく僅かな部分にすぎない。

したがって、請求の範囲18、21及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

そこで、この国際調査報告では、請求の範囲18、21の発明については、明細書に具体的に記載されたもの、即ち、抗体について、先行技術文献調査を行った。

請求の範囲19のiv)の低分子化合物について、特許協力条約第6条の意味において明細書に裏付けられ、また、特許協力条約第5条の意味において明細書に開示されているものは何ら見いだせない。

したがって、請求の範囲19及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

そこで、この国際調査報告では、請求の範囲19の発明については、i) - iii)の抗体について、先行技術文献調査を行った。

This Page Blank (uspto)

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

This Page Blank (uspto)